

活血化瘀、益气补肾中药复方对高糖刺激下大鼠肾小球系膜细胞增殖及纤维连接蛋白表达的影响

刘丹丹¹ 韩文霞¹ 宋玉文² 娄凯¹ 于春晓¹ 高聆³ 赵家军¹

摘要 **目的** 研究活血化瘀、益气补肾中药复方对高糖刺激下大鼠肾小球系膜细胞(RMCs)增殖及纤维连接蛋白(FN)表达的影响。**方法** 以大鼠 RMCs 为研究对象,用高糖和不同浓度的中药处理 RMCs,分别作用 24、48 h 后,用噻唑蓝(MTT)法检测 RMCs 的增殖情况,实时定量 PCR 法检测 FN mRNA 表达,ELISA 法检测 FN 蛋白表达。**结果** 处理 24 h 和 48 h,与对照组比较,单纯高糖组细胞增殖明显升高($P < 0.01$, $P < 0.01$);FN mRNA 表达及蛋白表达也明显升高($P < 0.01$);与高糖组比较,24 h 时各浓度中药组 RMCs 增殖及 FN 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$);48 h 时各浓度中药组 RMCs 增殖及 FN 蛋白及 mRNA 表达较高糖组明显下降($P < 0.01$, $P < 0.01$)。**结论** 高糖能够刺激 RMCs 增殖及 FN 蛋白及 mRNA 表达,中药处理 24 h 对高糖刺激的 RMCs 增殖及 FN 蛋白及 mRNA 表达的作用不明显,中药处理 48 h 能够逆转高糖刺激下 RMCs 的增殖及降低 FN 蛋白及 mRNA 的表达。

关键词 中药复方;肾小球系膜细胞;纤维连接蛋白

Effect of Chinese Herbal Compounds for Blood Activating Stasis Removing, Qi Benefiting Shen Invigorating on High Glucose Stimulated Proliferation of Renal Mesangial Cells and Expressions of Fibronectin LIU Dan-dan¹, HAN Wen-xia¹, SONG Yu-wen², LOU Kai¹, YU Chun-xiao¹, GAO Ling³, and ZHAO Jia-jun¹ 1 Department of Endocrinology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Institute of Endocrinology and Metabolism, Shandong Clinical Medicine Academy, Jinan (250021), China; 2 Department of Anesthesia, West Ward of Shandong Provincial Hospital, Jinan (250022), China; 3 Central Laboratory, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan (250021), China

ABSTRACT **Objective** To study effects of Chinese Herbal Compounds (CHC) for blood activating stasis removing (BASR), qi benefiting Shen invigorating (QBSI) on high glucose stimulated proliferation of renal mesangial cells (RMCs) and expressions of fibronectin (FN). **Methods** Rats' RMCs were dealt with high glucose and different concentrations of Chinese medicine for 24 and 48 h respectively. The proliferation of RMCs was detected with 4-A thiazolyl blue. mRNA expressions of FN was detected by real time quantitative PCR. The protein expression of FN was detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the proliferation obviously increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) after 24 and 48 h of treatment in the high glucose group. mRNA and protein expressions of FN also increased ($P < 0.01$). There was no statistical difference in the proliferation of RMCs or expressions of FN at 24 h between each CHC group and the high glucose group ($P > 0.05$). Compared with the high glucose group, the proliferation of RMCs and expressions of FN at 24 h each obviously decreased in the CHC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** High glucose could promote the proliferation of RMCs and induce expressions of FN. No obvious effect could be stimulated by CHC treatment for 24 h. The proliferation of RMCs, protein and mRNA expressions of FN could be reversed by CHC treatment for 48 h.

KEYWORDS Chinese herbal compound; renal mesangial cell; fibronectin

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30701130);国家自然科学基金资助项目(No. 81273880)

作者单位:1.山东大学附属省立医院内分泌科,山东省内分泌代谢病临床医学中心,山东省临床医学研究院内分泌与代谢研究所(济南 250021);2.山东省立医院西院麻醉科(济南 250022);3.山东大学附属省立医院中心实验室(济南 250021)

通讯作者:韩文霞, Tel:15168889956, E-mail:hanwx97@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.10.1400

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病微血管并发症之一,又称为肾小球硬化症^[1]。中医学认为糖尿病肾病多因消渴日久及脾肾,脾肾两虚,痰浊瘀血阻络而成^[2,3]。健脾益肾、活血化瘀中药复方针对糖尿病肾病的病因病机,标本兼顾,扶正以祛浊,能显著改善早期糖尿病肾病临床症状。据报道,系膜区扩张是早期糖尿病肾病的主要病理变化,而系膜区扩张主要是由于细胞外基质的沉积和系膜细胞增殖^[4],纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和胶原蛋白是细胞外基质的主要组成成分。为进一步探明 DN 发病和中药的作用机制,本实验通过培养大鼠肾小球系膜细胞(renal mesangial cells, RMCs),观察中药复方对高糖环境下 RMCs 增殖及 FN 蛋白及 mRNA 表达的影响,分析高糖与早期 DN 病理改变的关系及中药疗效机制。

材料与方

1 细胞株 RMCs 购自中国典型培养物保藏中心。

2 药物 活血化瘀、益气补肾中药颗粒购自山东省中医院同一批次制剂。该中药复方组成及 1 日药量为黄芪 18 g 枸杞子 6 g 山萸肉 9 g 山药 30 g 红花 6 g 牡丹皮 12 g 泽泻 6 g 茯苓 9 g 桃仁 6 g 生地 12 g 熟大黄 6 g 肉桂 3 g 猪苓 6 g 马齿苋 9 g 路路通 6 g 等,由山东省中医院加工制成中药颗粒冲剂 6 g,每包 3 g,密闭包装,每 1 g 颗粒剂相当于生药 24 g,避光干燥恒温保存备用。将活血化瘀、益气补肾中药颗粒按 0.2 g/mL 的浓度溶于蒸馏水中,充分震荡混匀,2 000 r/min 离心 30 min,取上清,通过定性滤纸、0.44 μm 滤器、0.22 μm 滤器层层过滤,根据实验所需药物浓度,计算相应的中药药液体积,加入细胞培养皿中。

3 试剂及仪器 低糖(5.6 mmol/L)DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司。Trizol、M-MuLV 逆转录酶、Taq 聚合酶、SYBR-Green 购自宝生物(大连)工程有限公司。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。大鼠纤维连接蛋白 ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。CO₂ 培养箱购自日本 SANYO, HERA cell 240, Thermo ELECTROW CORPORATION, 超净工作台购自 AIR TECH 苏静集团安泰公司,酶标仪购自 SpectraMax M₂。

4 方法

4.1 RMCs 培养及传代 RMCs 常规复苏后移入细胞培养皿中静置培养。培养基由体积分数为

10% FBS、青链霉素和 DMEM 组成。培养瓶置于体积分数为 5% CO₂, 37 °C 饱和湿度条件下培养 2~3 天,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞传代。采用对数生长期的细胞制成一定浓度的单细胞悬液,接种于 96 孔板或 6 孔板置于培养箱培养。

4.2 中药对 RMCs 毒性 采用噻唑蓝(MTT)法检测。RMCs 细胞以 1×10^4 密度接种于 96 孔培养板。细胞完全贴壁后,用无血清的低糖型 DMEM 培养液同步化细胞 24 h 后换用完全培养基,根据我们前期动物实验的用量,选择了不同的中药处理浓度。分组如下:对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖)及 0.65 mg/mL 中药组、1.25 mg/mL 中药组、高浓度 2.5 mg/mL 中药组。每组浓度设 5 个复孔,其他条件相同。将培养板移入 CO₂ 孵箱中,培养 24 h 及 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μL,37 °C 避光继续孵育 4 h,终止培养。吸去孔内上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶解液振荡 10 min,待结晶物充分溶解后,酶标仪上检测各孔光吸收值(A490)。

4.3 RMCs 增殖 采用 MTT 法检测。RMCs 细胞以 1×10^4 密度接种于 96 孔培养板。细胞完全贴壁后,用无血清低糖型 DMEM 培养液同步化细胞 24 h 后换用完全培养基,根据细胞毒性实验结果,选择 0.65 mg/mL 和 1.25 mg/mL 中药浓度处理细胞,分为对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖加 24.4 mmol/L 甘露醇组)、高糖组(HG 组,30 mmol/L 葡萄糖组)、HG 加 0.65 mg/mL 中药组、HG 加 1.25 mg/mL 中药组。每组浓度设 5 个复孔,其他条件相同。将培养板移入 CO₂ 孵箱中,培养 24 h 及 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μL,37 °C 避光继续孵育 4 h,终止培养。吸去孔内上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶解液振荡 10 min,待结晶物充分溶解后,酶标仪上检测各孔光吸收值(A490)。

4.4 FN mRNA 表达 采用实时定量 PCR 检测。收集各组细胞,用 Trizol 严格按照说明书要求提取各组细胞总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳见 18s、28s 条带清晰,表明 RNA 分子无降解。参照逆转录操作试剂盒说明书合成 10 μL cDNA,PCR 扩增 GAPDH 基因及 FN 基因片段。引物序列:FN-F:5'-TGG AGA GAC AGG AGG AAA TAG C-3', FN-R:5'-CAG TGA CAG CAT ACA GGG TGA T-3'; GAPDH-F:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC-3', GAPDH-R:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。扩增条件:95 °C 5 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s 循环 40 次。取其循环阈值(Ct 值),采用比较 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 FN 基因在细胞中的相对含量:即以管家基因 GAPDH 作为内参基因相对定量,以各基因在对照组中的表达为对照,

计算各组细胞中的 FN 的 $\Delta\Delta Ct$ 。 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 实验组} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 对照组}$,以 $\Delta\Delta Ct$ 作为定量结果进行统计分析,则目的基因的量 $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

4.5 RMCs 上清中 FN 蛋白的含量 采用双抗夹心酶联免疫吸附(ELISA)法检测细胞上清中 FN 蛋白的含量,按试剂盒说明书进行,每组设 6 孔,根据标准品的标准曲线计算相应的含量。

4.6 统计学方法 全部数据使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,全部实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一时间点各组样本间的比较采用单因素方差分析,对方差齐性的资料采用 LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 中药对 RMCs 的毒性实验(表 1) 处理 24、48 h,2.50 mg/mL 中药组 RMCs 的增殖率较对照组分别下降了 27.6% 和 23.0%,与 0.65 mg/mL、1.25 mg/mL 中药组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示 2.50 mg/mL 中药对 RMCs 有毒性作用,0.65 mg/mL 中药和 1.25 mg/mL 中药对 RMCs 无毒性作用。

表 1 中药对 RMCs 的毒性实验 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	A490	
		24 h	48 h
对照	5	0.451 4 $\pm$ 0.056 8	0.718 6 $\pm$ 0.061 1
0.65 mg/mL 中药	5	0.469 8 $\pm$ 0.056 2 $^{\Delta}$	0.708 6 $\pm$ 0.053 0 $^{\Delta}$
1.25 mg/mL 中药	5	0.501 2 $\pm$ 0.125 5 $^{\Delta}$	0.726 4 $\pm$ 0.080 9 $^{\Delta}$
2.50 mg/mL 中药	5	0.262 6 $\pm$ 0.088 2 *	0.559 8 $\pm$ 0.079 2 *

注:与对照组同期比较, $^*P < 0.01$;与 2.50 mg/mL 中药组同期比较, $^{\Delta}P < 0.01$

2 各组 RMCs 增殖比较(表 2) 处理 24 h 和 48 h,HG 组 OD 值较对照组比较分别升高了 37.7% 和 44.5% ($P < 0.01$)。与 HG 组比较,HG 加 0.65 mg/mL 中药组的增殖率差异有统计学意义($P < 0.05$)。处理 48 h,与 HG 组比较,HG 加 0.65 mg/mL、HG 加 1.25 mg/mL 中药组 OD 值较 HG 组 OD 值分别下降了 31.6% 和 29.1% ($P < 0.01$)。说明 HG 加 0.65 mg/mL 中药及 HG 加 1.25 mg/mL 中药处理 48 h 能逆转高糖刺激下的 RMCs 的增殖。

3 各组 RMCs FN mRNA 表达量比较(表 3) 与对照组比较,HG 组处理 24、48 h RMCs FN mRNA 的表达量分别是对照组的 2.45 倍和 2.40 倍,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 HG 组比较,HG 加

表 2 各组 RMCs 增殖比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	A490	
		24 h	48 h
对照	5	0.404 4 $\pm$ 0.023 1	0.682 2 $\pm$ 0.094 4
HG	5	0.557 0 $\pm$ 0.047 1 *	0.985 8 $\pm$ 0.215 8 *
HG 加 0.65 mg/mL 中药	5	0.479 2 $\pm$ 0.071 8 $^{\Delta}$	0.674 4 $\pm$ 0.137 2 $^{\Delta\Delta}$
HG 加 1.25 mg/mL 中药	5	0.504 4 $\pm$ 0.037 3	0.699 8 $\pm$ 0.100 6 $^{\Delta\Delta}$

注:与对照组同期比较, $^*P < 0.01$;与 HG 组同期比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

0.65 mg/mL 中药组、HG 加 1.25 mg/mL 中药组 24 h FN mRNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。而处理 48 h,HG 加 0.65 mg/mL 中药组和 HG 加 1.25 mg/mL 中药组 FN mRNA 的表达较 HG 组分别下降了 52% 和 44% ($P < 0.01$),但 HG 加 0.65 mg/mL 中药组与 HG 加 1.25 mg/mL 中药组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 HG 加 0.65 mg/mL 中药及 HG 加 1.25 mg/mL 中药处理 48 h 能降低高糖环境下 RMCs FN mRNA 表达。

表 3 各组 RMCs FN mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	FN mRNA	
		24 h	48 h
对照	3	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
HG	3	2.446 7 $\pm$ 0.150 4 *	2.397 5 $\pm$ 0.229 8 *
HG 加中药 0.65 mg/mL	3	2.193 3 $\pm$ 0.172 1	1.145 0 $\pm$ 0.205 1 $^{\Delta}$
HG 加中药 1.25 mg/mL	3	2.196 7 $\pm$ 0.550 8	1.349 0 $\pm$ 0.142 8 $^{\Delta}$

注:与对照组同期比较, $^*P < 0.01$;与 HG 组同期比较, $^{\Delta}P < 0.01$;表 4 同

4 各组 RMCs FN 蛋白表达比较(表 4) 与对照组比较,高糖处理 24 h 及 48 h,RMCs FN 蛋白表达升高 1.80 倍和 1.90 倍($P < 0.01$),与 HG 组比较,HG 加 0.65 mg/mL 中药、HG 加 1.25 mg/mL 中药处理 24 h 差异无统计学意义($P > 0.05$)。处理 48 h,与 HG 组比较,HG 加 0.65 mg/mL 中药组及 HG 加 1.25 mg/mL 中药组 FN 蛋白表达分别下降 46% 及 39% ($P < 0.01$)。提示 HG 加 0.65 mg/mL 中药及 HG 加 1.25 mg/mL 中药均能降低高糖环境下 RMCs FN 蛋白表达,HG 加 0.65 mg/mL 的作用稍强于 HG 加 1.25 mg/mL 中药组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组 RMCs FN 蛋白表达比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	FN 蛋白	
		24 h	48 h
对照	6	37.676 7 $\pm$ 7.966 8	68.866 7 $\pm$ 3.540 7
HG	6	67.718 3 $\pm$ 5.807 7 *	131.531 7 $\pm$ 9.266 6 *
HG 加中药 0.65 mg/mL	6	59.416 7 $\pm$ 9.466 1	71.573 3 $\pm$ 5.521 7 $^{\Delta}$
HG 加中药 1.25 mg/mL	6	60.250 0 $\pm$ 15.976 1	80.803 3 $\pm$ 14.813 0 $^{\Delta}$

讨 论

肾小球系膜细胞增殖是 DN 的特征性病理改变^[5]。我们的实验表明,30 mmol/L 葡萄糖作用于 RMCs 24、48 h 均能刺激 RMCs 的增殖,与 Wolf G^[4] 的体外研究及 Young BA 等^[6] 在糖尿病大鼠体内的研究结果是一致的。

FN 主要由肾小球系膜细胞生成,是肾小球系膜区细胞外基质蛋白的主要成分,经常作为细胞外基质积聚的指标^[7]。高糖等能够刺激肾小球系膜细胞的增殖,并且能够增加系膜区细胞外基质的分泌,包括 FN 和胶原蛋白等,最终导致了肾小球系膜区的扩张和肾小球纤维化^[8]。我们的实验结果也证实,高浓度葡萄糖能够刺激肾小球系膜细胞细胞外基质蛋白 FN 的分泌增多,因此,能够减少细胞外基质蛋白 FN 的分泌就能够减少细胞外基质的积聚,进而延缓肾小球的纤维化^[9]。

糖尿病的并发症发病部位分布广泛,其主要原因在于高血糖随血脉运行无处不至,因人之体质禀赋不同而有病变部位和程度的差异。人体的葡萄糖源于脾胃所运化的饮食,属水谷精微。水谷精微又有阴阳清浊之分,由水谷精微转化而来的葡萄糖在体内主要通过经络由血液输布。葡萄糖不仅为血液的组成成分,还有充养人体的功能。人体健康的维持依赖于体内各层次阴阳的内在平衡与机体对外界的调适。高血糖使血脉之中阳偏盛,阳盛则阴病,阳盛阴衰,营血之中阳盛则虚热内生,阴虚则内外失养,瘀血内生,故而糖尿病多见阴虚燥热瘀血之证^[10]。凡治消渴病的有效方药如六味地黄汤、玉液汤之类,多为养阴清营活血之品,单纯清解气分卫分之剂极为罕见。营血属阴,营血之阴阳失调首先危及血脉经络,有研究证实,糖尿病肾病存在血脂异常和血液流变学等病理改变^[11]。营血失调进而既可向外损及阳气,又可向内伤及五脏,全身各个器官组织无所不及,故而糖尿病并发症的种类也极多。

DN 正是由于消渴病日久失治,营血失调进一步发展,外损阳气,内伤脾肾,气不行血,阳不化水,痰瘀内生,郁滞肾脏,气化失职而发病。在本病发病早期,痰浊虽已内蕴,但水肿尚未显现,其病机关键又以“因虚致瘀”为主,脾肾亏虚与瘀血阻滞贯穿本病早期。

活血化瘀、益气补肾中药复方由生黄芪、枸杞子、山萸肉、山药、红花、丹皮、泽泻、茯苓、桃仁、生地、熟大黄等组成。方中生地、枸杞子、山萸肉、山药养营血,滋肾阴,填精气;生黄芪益气养血,行血利水;丹皮、熟大

黄清营泄热,活血祛瘀;桃仁、红花活血行气;泽泻、茯苓利湿泄浊。诸药相伍,清营活血,气血兼顾,脾肾双补,补而不滞,泻而不峻,泻中寓补,补中有泻,标本兼顾,切合病机。

我们的前期研究发现,该中药复方对 DN,特别是早期病变,具有良好的治疗作用,可明显减轻临床症状,降低血脂,改善血液流变学异常,减少尿微量白蛋白和改善肾功能,可明显降低 DN 模型大鼠增高的一氧化氮水平,降低血脂及尿微量白蛋白^[12]。本实验证实中药复方处理 RMCs 48 h 能够明显抑制 RMCs 的增殖及 FN mRNA 及蛋白的表达,为进一步研究中药复方的作用机制打下了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] 王吉耀主编. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 1040.
- [2] 程益春. 糖尿病肾病证治经验[J]. 江苏中医药, 2002, 23(12): 1-3.
- [3] 向少伟,王小琴. 糖尿病肾病中医病因病机研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(2): 77-78.
- [4] Gunter Wolf. Molecular mechanisms of diabetic mesangial cells. Hypertrophy: a proliferation of novel factors[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(10): 2611-2613.
- [5] Andrea Cove-Smith, Bruce M Hendry. The regulation of mesangial cell proliferation[J]. Nephron Exp Nephrol, 2008, 108(4): e74-e79.
- [6] Young BA, Johnson RJ, Alpers C, et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 1995, 4(3): 935-944.
- [7] Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(Suppl 1): s30-s33.
- [8] Hohenadel D, vander Woude FJ. Gene expression in diabetic nephropathy[J]. Curr Diabetes Rep, 2004, 4(6): 462-469.
- [9] Liu WH, Tang FT, Deng YH. Berberine reduces fibronectin and collagen accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 325(1-2): 99-105.
- [10] 陈长青,熊曼琪,李赛美. 消渴病(糖尿病)的病机研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(10): 72-74.
- [11] 胡筱娟,李群,李婷,等. 糖尿病肾病中医证型与瘀血证相关性研究[J]. 陕西中医, 2012, 33(11): 1487-1488.
- [12] 韩文霞. 糖肾康改善糖尿病肾病早期肾血流动力学异常及一氧化氮水平的研究[J]. 山东中医药大学学报, 2003, 27(4): 266-269.

(收稿:2012-11-16 修回:2013-07-10)