

愈肾颗粒不同药对配伍对肾小球系膜细胞基质金属蛋白酶-2 及其抑制剂-2 的影响

杨冠琦¹, 丁晓欢², 岳志军³, 张少卿³, 张君^{3*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁省中医药研究院, 沈阳 110032;
3. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110034)

[摘要] **目的:** 考察黄芪、太子参(益气摄血组), 牡丹皮、丹参(凉血化瘀组), 紫草、益母草(解毒化瘀组)3 组药对对大鼠肾小球系膜细胞基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2) m-RNA 表达的影响。**方法:** 应用血清药理学方法, 制取中药药对的含药血清。以血管紧张素 II (Ang II) 作为刺激因子, 培养大鼠肾小球系膜细胞, 使其发生增殖。应用反转录多聚酶链反应技术(RT-PCR)观察各组间 MMP-2, TIMP-2 的基因表达情况。**结果:** 益气摄血组对 TIMP-2 抑制作用显著, 与模型组比较有显著性差异; 其他 2 组虽有抑制趋势, 但无统计学意义。3 组药对对 MMP-2 的影响均无统计学意义。**结论:** 黄芪、太子参可通过抑制 TIMP-2 的基因表达, 发挥防治肾小球硬化的作用。

[关键词] 肾小球系膜细胞; 血管紧张素 II; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶抑制剂-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0169-03

[doi] 10.11653/syfj2013120169

Effect of Different Couplet Medicines from Yushen Granules on Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in Mesangial Cell

YANG Guan-qi¹, DING Xiao-huan², YUE Zhi-jun³, ZHANG Shao-qing³, ZHANG Jun^{3*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;
2. Liaoning Province Institute of TCM, Shenyang 110032, China;
3. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Astragali Radix and Pseudostellariae Radix, Cortex Moutan Radicis and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Arnebiae Radix and Leonuri Herba on m-RNA expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in mesangial cell of rats. **Method:** Using serum pharmacological method, we got pharmacological serum of 3 couplet medicines. Cultured the glomerular mesangial cells and proliferated them with angiotensin II as stimulating factor. m-RNA expression of MMP-2 and TIMP-2 were measured by RT-PCR. **Result:** Effect of these 3 couplet medicines on MMP-2 were not statistically significant. Group of Astragali Radix and Pseudostellariae Radix obviously inhibited expression of TIMP-2, and there was significant difference by comparing with the model group; Other groups also could inhibit the expression of TIMP-2, but there were not statistically significant. **Conclusion:** Couplet medicines of Astragali Radix and Pseudostellariae Radix could play prevention and treatment roles of glomerulosclerosis by inhibiting gene expression of TIMP-2.

[收稿日期] 201301022(010)

[基金项目] 国家科技重大专项项目(2009ZX09103)

[第一作者] 杨冠琦, 在读博士, 从事中西医结合儿科研究, E-mail: y_g_q1983@yahoo.cn

[通讯作者] * 张君, 主任医师, 从事儿内科研究, Tel: 024-86291559, E-mail: zhangjun555678@sina.com

[**Key words**] mesangial cell; angiotensin II; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of metalloproteinase-2

肾小球硬化是多种原因引起肾小球损伤后的共同结局。从形态学角度观察,肾小球硬化表现为肾小球细胞的丧失和细胞外基质(ECM)的积聚^[1],其中 ECM 的过度合成及沉积和 ECM 降解受到抑制是肾小球硬化形成的主要机制之一。本实验根据张君教授临床研制的愈肾颗粒中药物的功效,甄选出 6 味中药,分成 3 组药对,通过观察每组药对对 MMP-2 及 TIMP-2 的 mRNA 表达情况筛选出作用效果最佳的药对,以进行更深入的研究。

1 材料

SW-CJ-2D 型单人净化台(苏州净化公司),SW-CJ-20D 型二氧化碳培养箱(Therom HERAce),3k15 型高速冷冻离心机(Sigma 公司),PE9600 型 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司),DU-600 型蛋白核酸分析仪(美国 Bechman),凝胶图像分析系统(Tanon Gis),EPS-300 型电泳仪(上海天能),JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。

健康 Wistar 大鼠 60 只,体重 150 ~ 170 g,雌雄各半,购自沈阳药科大学实验动物处,许可证号 SCXK(吉)2008-0005。肾小球系膜细胞株(北京中医药大学肾脏病研究所李平教授馈赠),黄芪、太子参、牡丹皮、丹参、紫草、益母草由辽宁中医药大学附属医院中药药剂科提供。血管紧张素 II(Ang II, Wako 公司,批号 014-18211),胎牛血清(FBS, Gibco 公司,批号 8131650),DMEM 培养基(Hyclone,批号 SH30022.01B),TRIZOL 总 RNA 提取试剂(Gibco 公司),反转录多聚酶链反应(RT-PCR)试剂盒(大连宝生物工程公司),PCR 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。MMP-2 上游引物:5'-CACCATCGCCCATCATCAAGT-3';下游引物:5'-TG-GATTCGAGAAAAGCGCAGCGG-3',长度 400 bp;TIMP-2 上游引物:5'-TGACGCTGCTCCCCGGTG-CAC-3';下游引物:5'-TGCTGAAGAGGGGGCCGTG-TAGAT-3',长度 210 bp。

2 方法与结果

2.1 含药血清的制备 中药水煎剂灌胃量按益气摄血(黄芪、太子参)高、中、低剂量组(含生药 3.78, 1.26, 0.42 g·mL⁻¹),凉血化瘀(牡丹皮、丹参)高、中、低剂量组(含生药 2.79, 0.93, 0.31 g·mL⁻¹),解毒化瘀(紫草、益母草)高、中、低剂量组(含生药 3.78, 1.26, 0.42 g·mL⁻¹)给药,正常组给予生理盐

水,连续灌药 3 d,末次给药 2 h 后采血,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,取上清,经 56 °C 水浴 30 min 灭活,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,置 -20 °C 保存,备用。

2.2 大鼠肾小球系膜细胞(MCs)的培养和分组 大鼠 MCs 常规培养于含 10% FBS 的 DMEM 中,于 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。传代培养 24 h 后分别加入含 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ AngII 和 10% 各药对不同浓度的含药血清中,继续培养 24 h,收集细胞待测。

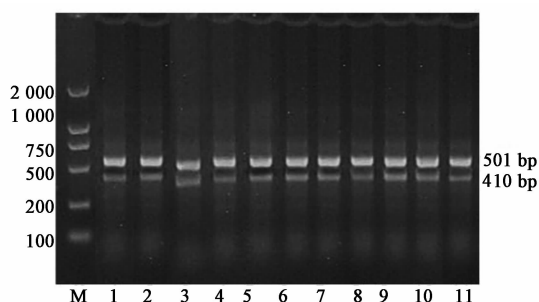
2.3 系膜细胞 MMP-2, TIMP-2 的基因表达 各组细胞试验结束后弃去培养基,用 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次,采用 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA。各组取总 RNA 2.5 μL 按 RT-PCR 试剂盒说明书操作。PCR 反应条件为 94 °C, 3 min 预变性;94 °C, 30 s;56 °C, 30 s;2 °C, 1 min;30 次循环后于 72 °C 延伸 5 min。取反应液 10 μL 以含溴乙锭的 2% 琼脂糖电泳 30 min(5 V·cm⁻¹),紫外分析仪上观察在 501 bp 处出现橙黄色条带,为阳性标本。以天能凝胶分析系统拍摄、定性定量分析。实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件处理,进行单因素方差分析,结果见表 1 和图 2。

表 1 愈肾颗粒不同药对对大鼠 MCsTIMP-2, MMP-2 基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·mL ⁻¹	TIMP-2	MMP-2
模型	-	0.75 ± 0.02	0.605 ± 0.025
正常血清	-	0.75 ± 0.04	0.580 ± 0.010
益气摄血	3.78	0.49 ± 0.02 ¹⁾	0.595 ± 0.125
	1.26	0.45 ± 0.05 ¹⁾	0.665 ± 0.055
	0.42	0.59 ± 0.06 ¹⁾	0.625 ± 0.025
凉血化瘀	2.79	0.60 ± 0.04	0.625 ± 0.055
	0.93	0.63 ± 0.03	0.590 ± 0.020
	0.31	0.79 ± 0.03	0.570 ± 0.000
解毒化瘀	3.78	0.73 ± 0.03	0.660 ± 0.040
	1.26	0.68 ± 0.02	0.585 ± 0.025
	0.42	0.59 ± 0.06	0.655 ± 0.055

注:与正常血清组及模型组比较¹⁾P < 0.05。

由表 1 可知,各药对对 MMP-2 mRNA 表达无影响;含药血清组大鼠肾小球系膜细胞 TIMP-2 比值明显低于模型(Ang II)组及正常血清组,尤以益气摄血组为著,说明益气摄血组含药血清可抑制 TIMP-2 mRNA 表达。由图 1 可知,在明暗或宽窄方面均匀一致,MMP-2 的 mRNA 的产物电泳带显示无明显不均一。由图 2 可知,各组肾小球系膜细胞 TIMP-2 mRNA 的产物电泳带显示明显的不均一,模



1. 模型组;2. 正常血清组;3. 益气组高剂量组;4. 益气组中剂量组;5. 益气组低剂量组;6. 凉血化瘀高剂量组;7. 凉血化瘀中剂量组;8. 凉血化瘀低剂量组;9. 解毒化瘀高剂量组;10. 解毒化瘀中剂量;11. 解毒化瘀低剂量组(图2同)

图1 MMP-2的RT-PCR电泳条带

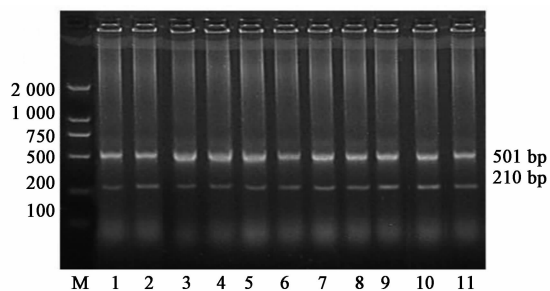


图2 TIMP-2的RT-PCR电泳条带

型组及正常血清组比其余各组电泳条带较明亮。

3 讨论

系膜细胞(MC)是肾小球重要的固有细胞之一,各种致病因素导致的系膜细胞增殖及合成的细胞外基质增加,是肾小球硬化的重要病理基础。在生理情况下,肾小球ECM的合成与降解处于平衡状态,这对于维持肾小球正常结构和功能起重要作用;在病理情况下,肾小球ECM合成增加和(或)降解减少,打破原有的平衡,引起ECM更新转换失去平衡^[2],导致ECM过度积聚,进而进展为肾小球硬化^[3-4]。ECM由蛋白降解酶降解,现在认为基质金属蛋白酶(MMPs)是最重要的一类降解ECM的蛋白酶类,在多种肾脏疾病中,MMPs活性下降参与了多种肾脏疾病的发生发展过程^[5],而其抑制剂TIMPs为MMPs的特异性抑制因子,其产生增多可抑制MMPs降解细胞外基质,加速肾小球硬化进程^[6]。MMP-2又称IV型胶原酶,其主要功能是降解ECM成分中的IV型胶原,在肾小球基底膜代谢过程中发挥重要作用^[7-8]。激活后其降解基质的活性还受基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-2)的调节,TIMP-2以高亲和力与活化的MMP-2结合,从而抑制其活性。

前期实验研究从蛋白质和细胞分子水平揭示了

愈肾颗粒具有显著的抑制转化生长因子-β₁基因表达的作用,并抑制肾小球MC基质中纤维黏连蛋白,IV型胶原的合成和分泌,促进ECM降解,从而有效的防治肾小球硬化^[9-10]。本实验将愈肾颗粒拆为3组药对,分别为益气摄血组、凉血化瘀组、解毒化瘀组,观察肾小球MC中MMP-2 mRNA,TIMP-2 mRNA表达变化,筛选最有效的方剂组成。

实验结果表明,黄芪-太子参药对具有显著抑制TIMP-2基因表达的作用,这可能是该复方防治肾小球硬化的作用机制。本实验还提示益气作用在该方中占主要地位,今后的研究重点可偏向黄芪、太子参。

[参考文献]

[1] 姚毓奇. 肾小球硬化研究进展[J]. 国外医学泌尿系统分,2003,23(3):297.
 [2] 赵慧颖,黄雯,黄海长,等. 基质金属蛋白酶在大鼠肾小球硬化中的表达[J]. 中国血液净化,2008,7(11):610.
 [3] 康熙雄. 临床免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:187.
 [4] 李玉林. 病理学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2008:25.
 [5] Han S Y, Jee Y H, Han K H, et al. An imbalance between matrix metallo-proteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant,2006,21(9):2406.
 [6] 郭兆安,房婧,赵鑫,等. 祛毒颗粒对5/6肾切除大鼠肾脏皮质MMP-2、TIMP-2、ECM及足细胞超微结构的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2011,12(7):582. [7] Catania J M, Chen G, Parrish A R. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2007,292(3):905.
 [8] Endo T, Nakabayashi K, Sekiuchi M, et al. Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the peripheral blood of patients with various glomerular diseases and their implication in pathogenetic lesions: study based on an enzyme linked assay and immunohistochemical staining[J]. Clin Exp Nephrol,2006,10(4):253.
 [9] 董娜,于英华,张君. 消斑愈肾剂对大鼠肾小球系膜细胞细胞外基质影响的研究[J]. 实用中医内科杂志,2003,17(6):450.
 [10] 张君,于英华,罗立欣,等. 愈肾颗粒对血管紧张素II刺激大鼠肾小球系膜细胞TGF-β表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2005,6(6):354.

[责任编辑 全燕]