

大黄酸对血管紧张素 诱导大鼠 近端肾小管上皮细胞肥大的影响

余德芊¹, 高原^{2*}, 刘晓红¹

(1. 遵义医学院生理学教研室, 贵州 遵义 563003;

2. 遵义医学院珠海校区生理学教研室, 广东 珠海 519041)

[摘要] 目的: 探讨大黄酸(rhein)对血管紧张素(angiotensin, Ang)诱导的大鼠近端肾小管上皮细胞肥大的影响。方法: 麻醉下无菌分离 SD 大鼠单根近球小管并培养, 以免疫细胞化学方法鉴定体外培养的肾小管上皮细胞。Ang (10^{-7} mol·L⁻¹) 培养肾小管上皮细胞, 与此同时, 加入不同剂量的大黄酸, 作用 72 h 后检测细胞体积、³H-亮氨酸掺入量以及蛋白质含量以观察细胞肥大的变化。结果: Ang 培养 72 h 导致细胞体积明显增大, ³H-亮氨酸掺入量及细胞内蛋白质含量明显增加。加入大黄酸处理 72 h 后, 大黄酸可明显降低 Ang 所致的细胞体积增大, 明显降低³H-亮氨酸掺入量及细胞内蛋白质含量的升高。结论: 大黄酸可抑制血管紧张素 诱导的肾小管上皮细胞肥大。

[关键词] 大黄酸; 血管紧张素; 近端肾小管上皮细胞; 细胞肥大

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0134-03

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见、最严重的慢性并发症之一, 由 DN 进展为肾功能衰竭和尿毒症是糖尿病病人死亡的首要原因^[1]。糖尿病早期肾脏肥大包括肾小球的肥大和肾小管的肥大。研究证实, 肾小管肥大对整个肾脏肥大起至关重要的作用, 血管紧张素(Ang)可诱导系膜细胞增殖和肥大可增加细胞外基质的合成^[2]。

大黄酸(rhein, 4, 5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid)是从中药大黄蒽醌衍生物中分离出的单体成分。有试验证实, 大黄及大黄酸对 DN 有明显的防治作用^[3-4]。但大黄酸对血管紧张素作用下的肾近端小管上皮细胞影响如何, 目前尚不清楚。本研究采用微分离方法分离并培养大鼠近端肾小管上皮细胞, 观察大黄酸对血管紧张素 诱导的大鼠肾近端小管上皮细胞肥大的影响, 为进一步探讨大黄酸对糖尿病肾病的肾脏保护作用及其机制提供试验依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠, 体重(250 ±20) g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(粤)2004-001。

1.2 试剂及仪器 RPMI1640 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司); 型胶原酶(Gibco 公司); Angiotensin II(Sigma 公司); 大黄酸(南京替斯艾么中药技术研究所); ³H-亮氨酸(中国科学院上海应用物理研究所); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程公司); 紫外分光光度计(日本岛津公司); 流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 分组 分为 5 组: 正常对照组, Ang 10^{-7} mol·L⁻¹ 组, 大黄酸 30 mg·L⁻¹ + Ang 10^{-7} mol·L⁻¹ 组, 大黄酸 15 mg·L⁻¹ + Ang 10^{-7} mol·L⁻¹ 组, 大黄酸 5 mg·L⁻¹ + Ang 10^{-7} mol·L⁻¹ 组, 每组 6 只动物。

2.2 细胞培养 参照刘红方法^[5], 大鼠麻醉成功后右侧卧位固定于鼠板上, 暴露肾脏, 灌注后迅速无菌摘下左肾, 在体视显微镜下, 0~4 的环境中, 玻璃微分针手工分离近球肾小管, 分离在 30~60 min 内完成。将挑好的近球小管吸入 25 cm² 的细胞培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于 37℃, 5% CO₂ 的孵育箱中培养。于第 3 天更换 1 次培养液, 以后每天更换 1 次。

[收稿日期] 2010-01-19

[基金项目] 珠海市科技基金项目(PC20052031)

[通讯作者] * 高原, 硕士生导师, Tel: 0756-7623306, E-mail: gy60211@yahoo.com.cn

[第一作者] 余德芊, 硕士研究生, 研究方向: 肾脏生理学, Tel: 0852-8609442, E-mail: shenglixue209@163.com

2.3 细胞体积检测 将原代肾小管上皮细胞接种于 24 孔板中,待细胞生长至 80% ~90% 融合后,换 1640/1% FBS 培养 24 h 后去培养液,加入 Ang (10^{-7} mol · L⁻¹),同时加入不同浓度的大黄酸,培养 72 h 后收集细胞。细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化至多数细胞形态变成圆形后,加入少量培养液终止消化, PBS 清洗 2 次,上流式细胞仪检测,以前向角散射光(forward side scatter, FSC) 的强度作为细胞大小的值。

2.4 ³H-亮氨酸掺入量检测 将原代肾小管上皮细胞接种于 24 孔板中,待细胞生长至 80% ~90% 融合后,换 1640/1% FBS 培养 24 h 后去培养液,加入 Ang (10^{-7} mol · L⁻¹),同时加入不同剂量的大黄酸,培养 48 h 后每孔加入 ³H-Leucine(2.5 μCi),72 h 后收集细胞,以 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶解细胞,再加入 1 mol · L⁻¹ HCl 中和,吸入闪烁瓶中,加入 5 mL 闪烁液,上液闪仪检测。同时设复孔计细胞数,掺入量以 cpm/10⁵ 个细胞表示。

2.5 细胞蛋白质含量测定 将原代肾小管上皮细胞接种于 24 孔板中,待细胞生长至 80% ~90% 融合后,换 1640/1% FBS 培养 24 h 后去培养液,加入 Ang (10^{-7} mol · L⁻¹),同时加入不同浓度的大黄酸,培养 72 h 后,去除培养液, PBS 清洗 2 次后,加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 待细胞完全溶解后,加入相同当量的 HCl 中和。以考马斯亮蓝法测定蛋白含量。同时

设复孔计细胞数,以 μg/10⁵ 细胞计量。

2.6 统计学处理 数据均以 ̄x ± s 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。两组间的比较采用 t 检验,多组间的比较采用方差分析, P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄酸对 Ang 诱导的肾小管上皮细胞体积增大的影响 经大黄酸 30 mg · L⁻¹ 培养 72 h 后,肾小管上皮细胞体积较 Ang 培养的细胞减小,表现为流式细胞仪检测前向角散射光(FSC) 的强度左移,而中、低剂量的大黄酸(15, 5 mg · L⁻¹) 对 Ang 导致的细胞体积增大无明显作用,见表 1。

3.2 大黄酸对 Ang 诱导的肾小管上皮细胞³H-亮氨酸掺入量增加的影响 与 Ang 组比,经大黄酸 30, 15 mg · L⁻¹ 培养 72 h 后,肾小管上皮细胞³H-Leucine 掺入量显著降低(P < 0.01, P < 0.05); 而大黄酸 5 mg · L⁻¹ 组对 Ang 所致的³H-Leucine 掺入量增加无明显抑制作用,见表 1。

3.3 大黄酸对 Ang 诱导的肾小管上皮细胞蛋白含量增加的影响 经大黄酸(30, 15 mg · L⁻¹) 培养 72 h 后,肾小管上皮细胞蛋白含量较 Ang 培养的细胞显著降低(P < 0.01), 大黄酸 5 mg · L⁻¹ 对 Ang 所致的细胞蛋白含量增加也有一定的抑制作用(P < 0.05), 见表 1。

表 1 大黄酸对 Ang 诱导肾小管上皮细胞肥大的影响(̄x ± s, n = 6)

组别	质量浓度 / mg · L ⁻¹	细胞体积 / FSC	³ H-亮氨酸掺入量 / cpm/10 ⁵ 个细胞	蛋白含量 / μg/10 ⁵ 个细胞
正常对照	-	112.98 ± 2.88 ²⁾	7 335 ± 838.3 ²⁾	3.50 ± 0.25 ²⁾
Ang	-	120.04 ± 2.87	14 938 ± 1 056.1	6.15 ± 0.20
Ang + 大黄酸	30	115.81 ± 2.68 ¹⁾	11 024 ± 1 720.3 ²⁾	4.43 ± 0.26 ²⁾
Ang + 大黄酸	15	116.91 ± 2.45	13 333 ± 1 524.8 ¹⁾	5.07 ± 0.23 ²⁾
Ang + 大黄酸	5	118.25 ± 2.64	14 331 ± 1 393.6	5.81 ± 0.35 ¹⁾

注:与血管紧张素 组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

4 讨论

DN 是糖尿病特发性全身微血管病变的肾脏表现。DN 肾脏肥大主要是指肾脏体积增大,包括肾小球体积增加和肾小管细胞肥大,尤以后者为著,约占整个肾脏体积的 90%。近年来,随着对肾小管病变在肾脏疾病进展与预后中作用的研究,发现肾小管上皮细胞在糖尿病肾病的发生发展中有着不可忽视的作用^[6]。

越来越多的证据显示,肾脏局部肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system) 的激活在慢性肾脏

硬化进展过程中起关键作用^[7]。有研究显示在糖尿病状态下,不仅 Ang 产生增加,肾脏对 Ang 的敏感性也增高,用血管紧张素转换酶抑制剂减少 Ang 的形成或用 Ang 受体拮抗剂阻断 Ang 的作用,对 DN 有肾保护作用,提示 Ang 参与 DN 的发病机制^[8]。

大黄酸是多种防治 DN 传统中药的有效成分之一。体外试验发现大黄酸可以抑制高糖培养条件下肾小球系膜细胞增殖、肥大以及细胞外基质合成的增加^[9], 以及转化生长因子-1(TGF-1) 诱导的肾

小管上皮细胞肥大及细胞外基质产生^[10]。本试验结果表明大黄酸可以抑制 Ang 诱导的肾小管上皮细胞肥大,并且呈现剂量依赖性,随着剂量的增加,抑制作用增强。大黄酸治疗糖尿病肾病的机制可能与其纠正机体及细胞代谢异常,降低 TGF-1 产生有关。本试验大黄酸抑制 Ang 诱导的肾小管上皮细胞的肥大是否也是通过抑制 TGF-1 的表达及活性实现的,有待进一步研究。

总之,本研究的结果进一步证实大黄酸可剂量依赖性抑制 Ang 诱导的肾小管上皮细胞肥大,为 大黄酸在防治糖尿病肾病方面的机制研究和临床应用提供了直接的试验依据。

[参考文献]

- [1] Zhou H, Tian H M, Long Y, et al. Mesenchymal stem cells transplantation mildly ameliorates experimental diabetic nephropathy in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(21): 2573.
- [2] Block K, Eid A, Griendling K K, et al. Nox4 NAD(P) H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression[J]. J Biol Chem, 2008, 283(35): 24061.
- [3] 杨俊伟,黎磊石,张真. 大黄治疗糖尿病肾病的实验研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1993, 9(3): 222.
- [4] 龚伟,黎磊石,孙骅,等. 大黄酸对糖尿病大鼠转化生长因子及其受体表达的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2006, 15(2): 101.
- [5] 刘红,罗蕾,高原. 鼠肾近曲小管微分离技术[J]. 川北医学院学报, 2004, 19(2): 10.
- [6] 刘志红,黎磊石. 糖尿病肾病发病机理[J]. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(2): 120.
- [7] Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase[J]. Proc Natl Acad Sci U SA, 2008, 105(41): 15896.
- [8] Kim S Y, Park K H, Gul R, et al. Role of kidney ADP-ribose cyclase in diabetic nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(2): 291.
- [9] 刘志红,李颖键,章精,等. 转化生长因子及大黄酸对肾小球系膜细胞葡萄糖转运蛋白功能的影响[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(10): 780.
- [10] 郭啸华,刘志红,戴春笋,等. 大黄酸抑制 TGF-1 诱导的肾小管上皮细胞肥大及细胞外基质产生[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2001, 10(2): 101.

[责任编辑 何伟]