

# 狼疮方含药血清对人近端肾小管上皮细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 表达及 CD40 及 RANTES 的影响

张亚杰, 阳 晓\*, 陈伟英, 孔庆瑜, 董秀清, 余学清  
(中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 观察狼疮方含药血清对人近端肾小管上皮细胞(HK-2)过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )及干扰素(INF $\gamma$ )和肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )诱导的白细胞分化抗原40(CD40)、受激活调节的正常T细胞表达和分泌因子(RANTES)表达的影响,探讨该复方体外抗炎效应及其可能机制。方法:制备狼疮方含药大鼠血清;HK-2细胞株体外培养,分组如下:(1)培养基对照组;(2)正常鼠血清对照组;(3)狼疮方含药血清组;(4)IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ 刺激组;(5)刺激+10%狼疮方血清组;(6)刺激+10%正常鼠血清对照组。采用免疫印迹(Western blot)检测PPAR $\gamma$ 蛋白表达,半定量逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测CD40 mRNA、RANTES mRNA表达水平。结果:(1)正常HK-2细胞基础量表达PPAR $\gamma$ ;10%狼疮方含药血清作用下,PPAR $\gamma$ 蛋白表达呈现时间依赖性先增高后降低的趋势。(2)正常HK-2细胞基础水平表达CD40、RANTES。IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ 刺激后,CD40和RANTES表达显著升高;10%狼疮方含药血清可显著抑制IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ 诱导的CD40和RANTES表达;正常鼠对照血清对CD40和RANTES表达无明显影响。结论:狼疮方含药血清可能通过激活PPAR $\gamma$ 途径抑制人近端肾小管上皮细胞CD40和RANTES表达,从而发挥抗炎效应。

**[关键词]** 狼疮方;肾小管上皮细胞;过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ;白细胞分化抗原40;受激活调节的正常T细胞表达和分泌因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)04-0029-05

## Effect of Lupus Recipe Contained Serum on the Expression of PPAR $\gamma$ and TNF $\alpha$ with IFN $\gamma$ Induced CD40 and RANTES on Renal Tubular Epithelial Cells

ZHANG Yarjie, YANG Xiao\*, CHENG Wei-ying, KONG Qing-yu, DONG Xiu-qing, YU Xue-qing  
(Department of Nephrology, 1st Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Lupus Recipe on the expression of PPAR $\gamma$  and TNF $\alpha$  with IFN $\gamma$  induced CD40 mRNA and RANTES mRNA on renal tubular epithelial cells (HK-2). **Methods:** Rats weighted 180~230 g were randomly divided into control group and treated group. The treated group was treated with Lupus Recipe (10 g·kg $^{-1}$ ·day $^{-1}$ ) daily, and the control group was given the same volume of PBS. Rats were sacrificed at 7 days after treatment. Serum of rats were collected. HK-2 cells were cultured in DMEM/F12 with 10% fetal bovine serum in vitro and were divided into following groups: the DMEM medium control group, the normal rat serum group and the Lupus Recipe contained serum group, IFN $\gamma$  (50  $\mu$ g·mL $^{-1}$ ) + TNF $\alpha$  (10 ng·mL $^{-1}$ ) group, IFN $\gamma$  (50  $\mu$ g·mL $^{-1}$ ) + TNF $\alpha$  (10 ng·mL $^{-1}$ ) with 10% drug-contained serum groups and IFN $\gamma$  (50  $\mu$ g·mL $^{-1}$ ) + TNF $\alpha$  (10 ng·mL $^{-1}$ ) with 10% normal rat serum group. The expression of PPAR $\gamma$  protein was measured by Western blotting analysis and the expression of CD40

**[收稿日期]** 2007-08-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30271668, 30572290);教育部博士点专项基金(2002055805);广东省重点攻关项目(2003C30202)

**[通讯作者]** \* 阳 晓, Tel: (020) 87335811; E-mail: yangxiao\_999@yahoo.com.cn

mRNA and RANTES mRNA was measured by RT-PCR. **Results:** HK-2 cells expressed low levels of PPAR $\gamma$ , CD40 mRNA and RANTES mRNA. Drug-contained serum of Lupus Recipe can up-regulate the expression of PPAR $\gamma$  protein. Activation of HK-2 cells by TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  resulted in an enhanced expression of CD40 mRNA and RANTES mRNA; The Drug-contained serum of Lupus Recipe can significantly blocked CD40 mRNA and RANTES mRNA expression in HK-2 cell line induced by IFN $\gamma$  plus TNF $\alpha$ . **Conclusions:** Drug-contained serum of Lupus Recipe up-regulated the expression of PPAR $\gamma$  protein and decreased CD40 and RANTES mRNA expression induced by IFN $\gamma$  plus TNF $\alpha$  in HK-2 cells. These immune modulation and anti-inflammation effects were partially mediated by PPAR $\gamma$ -dependent pathways and it could be one of the mechanisms of Lupus Recipe in preventing and treating LN.

[ **Key words** ] Lupus Recipe; renal tubular epithelial cells; PPAR $\gamma$ ; CD40; RANTES

系统性红斑狼疮(SLE)是自身免疫介导的、以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病,狼疮肾炎(LN)是SLE最常见和最严重的内脏损害。协同刺激信号白细胞分化抗原40(CD40)-CD40配体(CD40L)是免疫细胞间一种重要信号转导途径,我们以往的研究发现LN患者肾组织CD40和CD40L表达显著上调,并且与病变活动性相关<sup>[1]</sup>。CD40-CD40L信号活化诱导肾小管上皮细胞产生受激活调节的正常T细胞表达和分泌因子(regulated upon on activation on normal T cell expressed and secreted, RANTES)可能是LN间质炎症过程中的重要部分<sup>[2,3]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )是配体依赖性核转录因子超家族成员之一,不仅在能量代谢、脂肪细胞分化中起关键性作用,而且具有免疫抑制和抗炎效应,在自身免疫反应及炎症过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。本研究旨在研究狼疮方含药血清对体外培养人近端肾小管上皮细胞株(HK-2)PPAR $\gamma$ , CD40及RANTES表达的影响,探讨其免疫调节和抗炎效应的可能机制。

### 1 材料

**1.1 试剂和仪器** 人近端肾小管上皮细胞株(HK-2)(ATCC,美国),本实验所用细胞为第(10~20)代。重组人IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ (美国lifetech); DMEM/F12培养基、胎牛血清、0.02% EDTA-0.25%胰酶(美国GIBCO),Trizol逆转录试剂盒(美国Invitrogen);兔抗人PPAR $\gamma$ 一抗(博士德)生物素标记山羊抗兔二抗体(美国,Sant Cruz);化学发光试剂盒(美国,Pierce); PCR引物序列由上海博雅生物科技有限公司合成;超净工作台(ESCO,美国);CO<sub>2</sub>培养箱(Forma scientific,美国);PCR扩增仪(Biometra,美国);全自动凝胶成像和化学发光图像分析系统(ALPHA, FluorChem 8900,美国);AxioCam图像分析系统

(Zeiss 德国)。

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度

引物	正义链	反义链	扩增产物
CD40	5'-AGGTCCAAAGGCATCAAGC-3'	5'-TCTTCACCITACTTTGGCTACAG-3'	288 bp
RANTES	5'-GTTTACGGAAATCTCGCACC-3'	5'-GTCCGAGCCGCTGTAGTC-3'	299 bp
GAPDH	5'-AGTCCACTGGCGTCTCAG-3'	5'-GCTTGACAAAGTGGCTGTGAG-3'	638 bp

**1.2 药物** 狼疮方主要由白花蛇舌草、紫草、丹参、生地等组成,由中山大学附属第一医院制剂中心协助制备,生药加入10倍量水浸泡30min后煎煮2次,每次2h,过滤,减压浓缩至2g(生药)·mL<sup>-1</sup>,灭菌过滤后4℃保存备用。

### 2 方法

**2.1 含药血清制备** 雄性SD大鼠(180~200)g,16只,由中山大学医学院动物实验中心提供。大鼠称重后随机分为对照组(n=6)和狼疮方组(n=12)。狼疮方组每只大鼠给予狼疮方灌胃,按照生药10g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,每日1次,连续7d;对照组给予等容积生理盐水。于末次给药后60min,大鼠以1.5%苯巴比妥麻醉后,无菌条件下腹主动脉取血,离心分离血清,经56℃,30min灭活后,0.22 $\mu$ m滤膜除菌过滤,-80℃保存备用。

**2.2 细胞培养与实验分组** HK-2细胞在含10%胎牛血清DMEM/F12培养基、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,生长至70%~80%时置无血清培养基培养24h使细胞同步于G<sub>0</sub>期。将细胞分成下列各组:(1)正常对照组;(2)狼疮方含药血清组;(3)正常鼠血清组;(4)IFN $\gamma$ (50 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>+TNF $\alpha$ (10ng·mL<sup>-1</sup>)刺激组;(3)IFN $\gamma$ (50 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>)+TNF $\alpha$ (10ng·mL<sup>-1</sup>)+10%狼疮方血清对照组;(4)IFN $\gamma$ (50 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>)+TNF $\alpha$ (10ng·mL<sup>-1</sup>)+10%正常鼠血清对照组。每组设3个复孔,正常对照孔仅加不含血清的DMEM/F12培养基。

### 2.3 蛋白印迹(Western blotting)检测 PPAR $\gamma$ 表达

选择对数生长期细胞, 细胞分组处理后, 细胞裂解液提取总蛋白, 比色法测定蛋白浓度后, 取同等量细胞总蛋白, 加入等体积  $2 \times$  上样缓冲液( $62.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% 甘油,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, 0.01% w/v 溴酚蓝), 煮沸 5 min 后进行 10% SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后, 凝胶上的蛋白质于  $4^\circ\text{C}$  200 mA 电转移 1.5 h 至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜在平缓摇动的摇床上以 20 mL 含 5% 脱脂奶粉的 TBST ( $1 \times$  TBS, 0.1% Tween 20) 室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入兔抗人 PPAR $\gamma$  多克隆抗体(1:400 稀释)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入生物素标记的羊抗兔二抗(1:2000 稀释) 在室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。膜稍滴干后加入化学发光试剂显色 2 min, 迅速用保鲜膜包好后置于暗盒内与胶片贴在一起曝光, 曝光时间依发光强弱而定。X 胶片经显影、定影后用全自动凝胶成像和化学发光图像分析系统扫描成像, 分析蛋白质灰度值。蛋白相对含量用产物条带密度 A 值与 GAPDH 吸光度 A 值之比半定量表示。每组实验重复 3 次。

### 2.4 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测 CD40, RANTES mRNA 表达

按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。以 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳及分光光度计鉴定 RNA 质量和浓度。逆转录采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 含 RNA 1  $\mu\text{g}$ , 以 Oligo(dT)<sub>20</sub> 为引物, 按照 ThermoScript RT-PCR system 操作说明书进行。CD40, RANTES 及 GAPDH 基因序列通过 Gene Bank 获得。PCR 引物利用 primer prime 5 软件设计, 由上海博亚生物工程公司合成。引物序列和扩增片段长度如表 1 所示。PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 反应条件如下: CD40:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94^\circ\text{C}$  30s,  $56^\circ\text{C}$  30s,  $72^\circ\text{C}$  30s, 循环 29 次, 再以  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min; RANTES:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94^\circ\text{C}$  30s,  $56^\circ\text{C}$  30s,  $72^\circ\text{C}$  30s, 循环 29 次, 再以  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min; GAPDH 以  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94^\circ\text{C}$  30s,  $55^\circ\text{C}$  30s,  $72^\circ\text{C}$  45s, 循环 28 次, 再以  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min, GAPDH 作为内参照。反应结束后, 取 10  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色。用全自动凝胶成像和化学发光图像分析系统扫描成像, 分析电泳带灰度值。mRNA 相对含量用产物条带密度 A 值与 GAPDH 吸光度 A 值之比半定量表示。每组实验重复 3 次。

### 2.5 统计学处理

统计数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 狼疮方含药血清对 HK-2 PPAR $\gamma$ 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示: 常规培养条件, HK-2 细胞可表达一定量的 PPAR $\gamma$ , 经 10% 狼疮方含药血清作用 3 h 后, PPAR $\gamma$  表达与正常对照组相比显著增加( $P < 0.01$ ), 然后逐渐下降至近基础值, 至 48 h PPAR $\gamma$  表达再次升高( $P < 0.01$ ) (见图 1)。

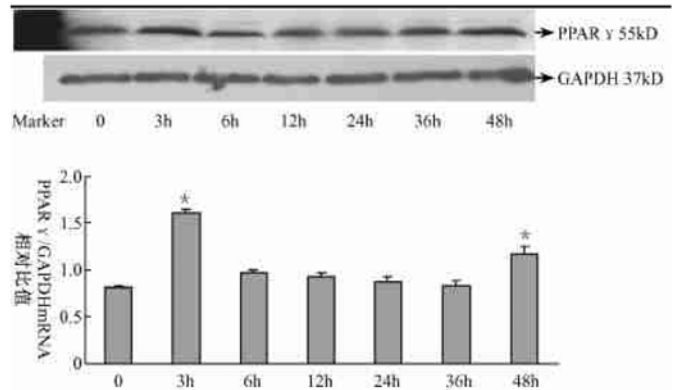


图 1 狼疮方含药血清对 HK-2 PPAR $\gamma$  蛋白表达的影响  
与 0 h 组比较, \*  $P < 0.01$

### 3.2 狼疮方含药血清对 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ 诱导 HK-2 细胞 CD40 mRNA 表达的影响

常规培养条件下, HK-2 细胞低水平表达 CD40 mRNA; TNF $\alpha$  ( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + IFN $\gamma$  ( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 刺激细胞 12 h 后, CD40 mRNA 表达与正常对照组比较显著升高, 约为正常对照组 3.09 倍( $P < 0.01$ ); 加入 10% 狼疮方含药血清共同孵育后, CD40 mRNA 表达较单纯 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$  刺激组显著下降( $P < 0.01$ )。而对照组正常大鼠血清对 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$  诱导的 CD40 mRNA 表达无显著影响; 单独使用狼疮方含药血清和对照正常大鼠血清对基础 CD40 mRNA 表达亦无明显影响(见图 2)。

### 3.3 狼疮方含药血清对 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ 诱导 HK-2 细胞 RANTES mRNA 表达的影响

常规培养条件下, 正常 HK-2 细胞低水平表达 RANTES mRNA; IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$  刺激细胞 12 h, RANTES mRNA 表达显著升高约为正常对照组 1.92 倍( $P < 0.01$ ); 加入 10% 狼疮方含药血清共同孵育后, RANTES mRNA 表达较单纯 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$  刺激组显著下降( $P < 0.01$ ); 而对照组正常大鼠血清对 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$  诱导的 CD40 mRNA 表达无显著影响, 单独使用狼疮方含药血清和对照正常大鼠血清对基础 RANTES mRNA 表达无明显效应(见图 3)。

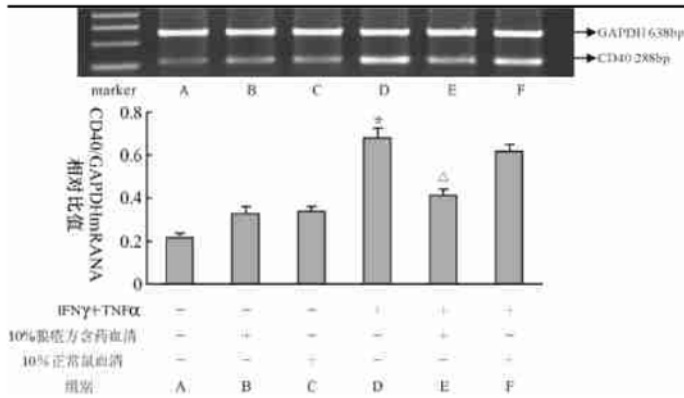


图 2 狼疮方含药血清对 IFN $\gamma$  和 TNF $\alpha$  诱导 HK-2 细胞 CD40 mRNA 表达的影响  
与 A 组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 D 组比,  $\Delta P < 0.01$

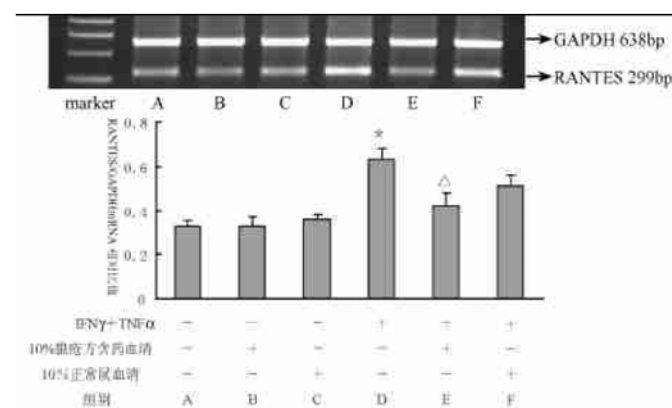


图 3 狼疮方含药血清对 IFN $\gamma$  和 TNF $\alpha$  诱导 HK-2 细胞 RANTES mRNA 表达的影响  
与 A 组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 D 组比,  $\Delta P < 0.01$

#### 4 讨论

协同刺激信号 CD40-CD40L 是免疫细胞间一种重要信号转导途径<sup>[5]</sup>。正常肾小管上皮细胞可表达 CD40。肾脏局部炎症条件下,局部浸润的 CD40L<sup>+</sup> 细胞活化肾小管上皮细胞 CD40 受体,导致肾小管上皮细胞分泌白细胞介素-6(IL-6) IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) RANTES 等多种细胞因子和趋化因子,其中 RANTES 对 T 淋巴细胞、巨噬细胞具有强烈趋化作用,并具有潜在激活 T 细胞的功能,诱导多种炎症因子如 TNF $\alpha$ , IL-1, 黏附分子等大量表达,进一步加大肾小球疾病炎症瀑布效应,加速肾脏病理改变<sup>[6]</sup>。我们以往的研究表明,狼疮肾炎肾组织肾小管上皮细胞有 CD40 表达,间质浸润的炎症细胞高表达 CD40L,并发现 CD40 及 CD40L 的表达与肾组织病理损害密切相关;此外 IV 型狼疮肾炎患者近端肾小管上皮细胞 CD40 和 RANTES 的表达显著升高且两者间具有显著相关性<sup>[1]</sup>。提示 CD40-CD40L 信号活

化诱导肾小管上皮细胞产生 RANTES 可能是 LN 间质炎症过程中的重要部分。PPAR $\gamma$  属于核受体超家族中的转录因子,在正常肾小球和近端肾小管上皮细胞均有结构性表达。PPAR $\gamma$  活化可通过抑制 NF- $\kappa$ B, Stat, AP-1 等炎症反应中关键转录因子的信号转导,在转录水平抑制多种炎症因子的表达。此外 PPAR $\gamma$  在 T 细胞、B 细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞等多种免疫活性细胞均有表达,可从多种途径发挥免疫调节作用<sup>[4]</sup>。血液中 CD40L 水平可作为机体微炎症状态的一个重要指标,临床研究证实 PPAR $\gamma$  激动剂 troglitazone 可显著改善糖尿病患者外周血中 CD40L 水平,改善患者微炎症状态,显示一定的抗炎效应<sup>[7]</sup>。

炎症是自身免疫性疾病进展的主要调控点 (checkpoints) 之一。SLE 是自身免疫介导的、以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病。中医认为 SLE 的发病机理有内外两方面因素,内之根于脏腑阴阳失调,以肾阴亏损为主,外之因于热毒和湿热。此外瘀血病机贯穿 LN 病变过程中<sup>[8]</sup>。狼疮方具有清热解毒、活血化瘀的功效。用狼疮方配合免疫抑制剂治疗 LN,总有效率明显高于单纯西药组,同时复发率和副作用发生率亦显著低于单纯西药组<sup>[9]</sup>。在动物试验中发现,狼疮方能显著抑制慢性移植抗宿主病狼疮样肾炎小鼠脾细胞增殖反应和刀豆蛋白诱导的增殖反应,减少自身抗体的产生,显著抑制肾组织和淋巴细胞分泌 IL-6 和 IL-10,显著减少 RANTES 的表达,减少肾小球硬化,小管损伤和间质单核、巨噬细胞浸润<sup>[10,12]</sup>。本研究从体外水平证实:狼疮方含药血清可显著提高肾小管上皮细胞 PPAR $\gamma$  蛋白的表达水平,并呈现一定的时间依赖趋势。鉴于 PPAR $\gamma$  介导的抗炎效应在限制自身免疫和炎症反应中的重要作用,提示狼疮方诱导 PPAR $\gamma$  的表达升高,可能是其发挥抗炎效应中的一个重要靶点。进一步研究发现狼疮方含药血清能显著抑制细胞因子 IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$  诱导的肾小管上皮细胞 CD40 和 RANTES 的转录表达,提示其可能通过激活 PPAR $\gamma$  途径影响近端肾小管上皮细胞共刺激信号 CD40/CD40L 和 RANTES 的表达,从而发挥免疫调节和抗炎作用。本研究结果从 PPAR $\gamma$  通路介导的免疫抑制和抗炎角度探讨了狼疮方解毒活血功效的分子机理,为狼疮方治疗 LN 提供了实验依据。

## [参考文献]

- [ 1 ] 阳 晓,叶任高,关伟明,等. 狼疮肾炎患者肾组织 CD40 及其配体表达的免疫组织化学分析[J]. 中华风湿病学杂志 2001, 5( 1 ): 9-11.
- [ 2 ] 梁 鸣,阳 晓,许元文,等. 白介素 4 及 CD40 抗体作用下肾小管上皮细胞钙调神经磷酸酶活性及其与 RANTES 分泌的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20( 4 ): 277-281.
- [ 3 ] 梁 鸣,李幼姬,阳 晓,等. RANTES 在狼疮样小鼠肾组织中的表达及其意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17( 5 ): 323-326.
- [ 4 ] 张亚杰,阳 晓,余学清. 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  与肾小球疾病. 国际内科学杂志, 2006, 33( 5 ): 199-202.
- [ 5 ] Datta S. K and Kalled S: CD40-CD40 Ligand interaction in autoimmune disease[J]. Arthritis and Rheumatism, 1997, 40( 10 ): 1735-1745.
- [ 6 ] Kairaitis L, Wang Y, Zheng L, *et al.* Blockade of CD40-CD40 ligand protects against renal injury in chronic proteinuric renal disease[J]. Kidney Int, 2003, 64( 4 ): 1265-1272.
- [ 7 ] Varo N, Vicent D, Libby P, *et al.* Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones [ J ]. Circulation, 2003, 107( 21 ): 2664-2669.
- [ 8 ] 中国中医药学会内科肾病专业委员会. 中医临床肾脏病学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1997. 232.
- [ 9 ] 阳 晓,叶任高,裴超成. 狼疮方配合免疫抑制剂治疗狼疮肾炎临床观察[J]. 中国医刊, 2000, 35( 6 ): 45.
- [ 10 ] 梁 鸣,李幼姬,阳 晓,等. 中药狼疮方对狼疮样小鼠脾细胞体外分泌白细胞介素-6 和白细胞介素-10 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22( 5 ): 369-371.
- [ 11 ] 阳 晓,魏 毅,叶任高,等. 狼疮方对慢性 GVHDA 狼疮肾炎模型的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 5( suppl ): 74-77.
- [ 12 ] 梁 鸣,李幼姬,阳 晓,等. 中药狼疮方对狼疮样小鼠肾脏 RANTES 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2002, ( 9 ): 631-635.