

• 药理 •

防己茯苓汤加减对大鼠肾系膜细胞增殖 及基质金属蛋白酶-2的影响

喻嵘*, 张晓白, 闻晓东, 吴刚强
(湖南中医学院, 湖南长沙 410007)

[摘要] 目的: 观察防己茯苓汤加减方是否具有干预肿瘤坏死因子诱导后肾小球系膜细胞增殖的作用及对基质金属蛋白酶MMP-2的影响。方法: 采用大鼠肾小球系膜细胞培养进行体外研究, 用肿瘤坏死因子(TNF- α)刺激系膜细胞增殖, 再加入不同浓度防己茯苓汤加减方提取液对细胞进行干预, 用MTT法测定细胞增殖, 流式细胞仪分析细胞周期, 用ELISA法测定细胞培养液中肾小球系膜细胞基质金属蛋白酶(MMP-2)的含量。结果: 加入防己茯苓汤加减方提取液后, 系膜细胞的增殖程度受到显著抑制($P < 0.05$), 流式细胞仪DNA图示S期细胞数显著减少($P < 0.05$)。细胞培养液中MMP-2的表达增强($P < 0.05$)。结论: 防己茯苓汤加减方对肿瘤坏死因子诱导后肾小球系膜细胞的增殖具有抑制作用, 并可影响肾小球系膜细胞MMP-2的表达, 进而调整细胞外基质(ECM)的合成与降解。

[关键词] 防己茯苓汤; 肿瘤坏死因子; 肾小球系膜细胞; 细胞增殖; 基质金属蛋白酶-2

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)08-0025-03

Effect of Fangji Fuling Tang on proliferation and MMP-2 of Glomerular Mesangial Cells

YU Rong*, ZHANG Xiao-bai, WEN Xiao-dong, WU Gang-qiang
(TCM University of Hunan, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Fangji Fuling Tang on preventing glomerular mesangial cells' proliferation and affecting the expression of MMP-2. So as to provide experimental evidence for using Fangji Fuling Tang to cure Chronic kidney disease. **Method:** Glomerular mesangial cells were cultured. TNF- α was used as a stimulation to make the cells to proliferate. Then Fangji Fuling Tang at different doses was incubated with the cells. Cell vitality was evaluated and qualified by MTT. Cell cycle were analysed by Flow CytoMeter(FCM). Secretion of MMP-2 expression was measured by ELISA. **Results:** Glomerular mesangial cells' proliferation was inhibited ($P < 0.05$), the DNA diagram of Flow CytoMeter showed that the cell quantity in stage 'S' was reduced($P < 0.05$), the expression of MMP-2 was markedly increased($P < 0.05$) in Fangji Fuling Tang groups. **Conclusion:** Fangji Fuling Tang may inhibit glomerular mesangial cells' proliferation and influence the synthesis and degradation of extracellular matrix.

[Key words] Fangji Fuling Tang; TNF- α ; Glomerular mesangial cells; Proliferation; MMP-2

[收稿日期] 2005-11-29

[基金项目] 湖南省科技厅社会发展基金项目资助,
(00SSY1013-99)

[通讯作者] 喻嵘, Tel: (0731) 5381201; E-mail: yurong@21cn.com

近来研究表明许多肾脏疾病的发病机制关键^[1]在于肾小球系膜细胞增殖及其继发的炎症介质释放, 肾小球疾病时由于肾内炎性细胞浸润和肾内固有细胞增殖, 通过自分泌及旁分泌产生大量的细胞因子、多肽生长因子及血管活性因子等致纤维化因

子, 不仅促进细胞外基质 (ECM) 成分合成, 且通过抑制基质金属蛋白酶及纤维酶 (MMP-2) 的活性, 抑制 ECM 降解, 从而使肾小球及肾间质中大量 ECM 沉积, 使肾小球毛细血管和肾小球周围毛细血管压迫堵塞, 有效肾单位大量减少, 肾功能进一步损害。因此, 设法控制系膜细胞增殖及细胞外基质沉积对逆转肾小球损伤, 防止肾小球硬化具有重要意义。防己茯苓汤是《金匮要略》治水气病名方, 本研究以该方进行加减化裁, 具有解毒化瘀行水, 益气养阴健脾的作用, 用于体外培养的大鼠肾小球系膜细胞, 以期探讨该方干预肾小球系膜细胞增殖的作用及对基质金属蛋白酶 MMP-2 的影响。

1 材料

1.1 药物 防己茯苓汤加减方提取液: 汉防己 9g、黄芪 15g、茯苓 15g、甘草 6g、熟地 12g、肉桂 6g、大黄 6g、忍冬藤 12g、姜黄 9g、太子参 12g 均购自湖南中医药大学杏林药店, 经专家鉴定为正品。经煮沸、过滤、浓缩至浓度为每毫升药液含生药 1g。冷却后初次离心, 去掉药渣, 收集上清液。再加入分析纯乙醇至乙醇终浓度为 80%, 醇沉过夜。水浴蒸发掉乙醇, 至完全无醇味为止, 用双蒸馏水调整浓度至醇沉前浓度。然后离心 (7000r/min) 20min, 后收集上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 用 MEM 培养基配制成 0.2, 0.1g/mL 的两种浓度的溶液, 调整 pH 值至 7.2 左右, 分装小瓶内, 置于 4℃ 冰箱中保存备用。对照药物: 尿毒清 (广州康臣药业有限公司), 用 MEM 培养基配制成含尿毒清 0.2g/mL 的提取液。

1.2 大鼠肾小球系膜细胞株 Wistar 大鼠肾小球系膜细胞株 HBZY-1 (武汉中国典型培养物保藏中心), 传代细胞于 MEM 培养基中培养, 取培养的 3~7 代细胞用于实验。

1.3 试剂 肿瘤坏死因子 (TNF-α) 购于晶美生物制品有限公司, 用三蒸水将其稀释, 使其浓度为 100ng/mL, 0.22 μm 微孔过滤器滤过除菌。MEM 培养基 (不含葡萄糖, 美国 GIBCOBRL 产品; Lot: No. 1134568); 胎牛血清 (北京鼎国生物技术发展中心产品; Lot: C092); 胰蛋白酶 (美国 GIBCOL 公司分装; 消化活力 1: 250; Lot: C279); 二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 公司产品; Lot: PJ6023); 噻唑蓝 (MTT) (美国 Sigma 公司产品; Lot: 941112); 基质金属蛋白酶 (MMP-2) 试剂盒由大连泛邦生物有限公司提供 (美国 TPI Inc. 批号: Catalog No: RL540, Lot NO: 0409R1)。

1.4 主要仪器 超净工作台、细胞培养箱、倒置显微镜、酶标仪、流式细胞分析仪 (Becton Dickonson 公司, FACScan420 型)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞活性 将培养的系膜细胞转种至 96 孔培养板上, 细胞密度 1.5×10^7 /mL, 分为空白、模型、防己茯苓汤加减方高剂量与低剂量组, 对照组共 5 组, 每组 8 孔。相差显微镜观察细胞形态, 当细胞长势平稳后, 向模型组和中药干预组 4 组细胞每孔加入终浓度为 10ng/mL TNF-α^[3], 同时分别向加药组加入防己茯苓汤加减方 (根据预试验确定 2 个剂量) 终浓度 100mg 生药/mL (高剂量组) 和 50mg 生药/mL (低剂量组), 以及终浓度为 100mg/mL 的尿毒清, 于 37℃ 5% CO₂ 细胞培养箱中继续孵育 24h。24 h 后各组加入四甲基偶氮唑盐 (MTT), 继续培养 4h 后加入 DMSO, 待结晶溶解后用酶标仪于 492nm 处测 OD 值 (吸光度)。

2.2 药物对培养的肾小球系膜细胞的作用 将培养的大鼠系膜细胞种植于 6 孔培养板上, 随机分 5 组, 分组及药物处理同 2.1, 每组 8~10 孔。各组细胞药物处理后, 继续于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内孵育 24h。收集细胞培养液, 进行相关指标检测。系膜细胞用胰酶消化, 冷 Hanks 液洗涤 2 次后, 细胞用 70% 冷乙醇固定, 4℃ 保存过夜, 用流式细胞仪分析细胞周期。

2.3 指标检测 采用倒置显微镜观测细胞生长形态状况; MTT 法检测细胞活性; 流式细胞仪分析细胞周期^[2], 通过 DNA 图示做出对细胞在细胞周期 G0~G1, S 和 G2-M 阶段的产量的评估, 进而反映细胞增殖状况。MMP-2 含量检测: 采用酶联免疫吸附双抗夹心 ELISA 法, 加入 TMB (显色液) 显色, 大鼠 MMP-2 的浓度与 OD (492nm) 成正比, 操作严格按照试剂盒进行。

2.4 统计学处理 统计学资料采用 SPSS11.5 软件处理, 多组计量资料数据方差齐性的采用多样本方差分析, 组间比较用 *F* 检验; 数据方差不齐者采用秩和检验。以 *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 防己茯苓汤加减方对系膜细胞增殖的影响 结果见表 1。体外培养的系膜细胞 (MC) 经肿瘤坏死因子 TNF-α 诱导后, 模型组细胞活力明显高于空白组, 差异具有显著性意义 (*P* < 0.05), 表明 TNF-α 可

诱导肾小球系膜细胞增殖。加入中药防己茯苓汤加减方提取液的高、低剂量组 OD 值均低于模型组,且具显著差异性($P < 0.05$),与空白组比较无统计学意义,高、低两个剂量组之间无明显差异性。

表 1 TNF- α 及其给药后对 MC 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	TNF- α (ng/mL)	药物终浓度 (mg/mL)	OD 值
空白组(无 TNF- α 及中药)	—	—	0.5025 \pm 0.1648 ¹⁾
模型组(TNF- α 10ng/mL)	10	—	0.7058 \pm 0.1069
防己茯苓汤	10	100	0.5135 \pm 0.1013 ¹⁾
防己茯苓汤	10	50	0.5058 \pm 0.1045 ¹⁾
尿毒清对照组	10	100	0.8760 \pm 0.2902

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$ (下同)。

3.2 防己茯苓汤加减方对系膜细胞的细胞周期的影响 结果见表 2。模型组 S 期细胞数量比例显著多于空白组,与空白组比较有显著差异性($P < 0.05$),表明细胞增殖明显。G2-M 期细胞数量比例总体无显著差异。加入中药防己茯苓汤加减方提取液的高剂量组在 S 期的细胞数量比例明显低于模型组,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。

表 2 药物对系膜细胞各期细胞所占百分数的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	TNF- α (ng/mL)	药物终浓度 (mg/L)	n	G0-G1	S	G2-M
空白组	—	—	8	70.50 \pm 2.78 ¹⁾	13.96 \pm 5.85 ¹⁾	15.54 \pm 1.49
模型组	10	—	9	58.12 \pm 1.41	23.16 \pm 6.98	18.72 \pm 1.39
防己茯苓汤	10	100	9	61.22 \pm 2.49	17.32 \pm 3.19 ¹⁾	21.46 \pm 2.18
防己茯苓汤	10	50	8	59.80 \pm 3.67	20.26 \pm 8.06	19.94 \pm 1.10
尿毒清对照组	10	100	7	59.00 \pm 1.83	22.97 \pm 3.93	18.03 \pm 1.95

3.3 防己茯苓汤加减方对系膜细胞分泌 MMP-2 浓度的影响 结果见表 3。模型组的 MMP-2 含量明显低于未加 TNF- α 诱导的空白组($P < 0.05$)。防己茯苓汤加减方具有显著的促进肾小球系膜细胞分泌 MMP-2 的作用,而两个剂量组之间高剂量组表达 MMP-2 更明显(与模型组比 $P < 0.05$)。

表 3 防己茯苓汤加减方对各组细胞培养液中 MMP-2 浓度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (ng/mL)	药物终浓度 (mg/mL)	n	MMP-2 浓度 (pg/mL)
空白组	—	—	10	45.31 \pm 7.79 ¹⁾
模型组	10	—	9	21.10 \pm 4.99
防己茯苓汤	10	100	9	49.44 \pm 12.01 ¹⁾
防己茯苓汤	10	50	10	37.02 \pm 7.14
尿毒清对照组	10	100	7	42.97 \pm 3.93 ¹⁾

4 讨论

肾小球系膜细胞的增殖和肥大以及细胞外基质的积累是各种肾脏疾病常有的病理改变,最终导致

肾小球硬化。因而设法抑制肾小球系膜细胞的增殖及细胞外基质的积累对延缓肾脏病变具有重要意义。基质金属蛋白酶家族是肾脏内主要的基质降解酶体系,其表达量与活性的高低直接影响肾小球细胞外基质的表达量和局部沉积。MMP-2 可通过降解 IV 型胶原等基膜样基质而抑制肾小球内 ECM 的局部沉积。

防己茯苓汤是张仲景《金匮要略》水气病篇名方。仲景水气病不仅有风水、皮水、正水、石水的分类,还有气分、水分、血分的区别,后者从病机的角度强调了疾病的进展层次。水之停由于气,阳气虚衰,气机郁滞,气病可以及水。水饮内停,进而影响到血,造成瘀血停滞,而瘀血停滞反过来也可以影响到气和水,所谓“血不利则为水”。因而,治气治水治血是仲景辨治水气病的思想精华,对我们现今临床治疗肾脏疾病具有较为深远的影响。本研究即以防己茯苓汤的运用体会进行加减化裁,“气、血、水湿、虚、毒”同治组方,方中黄芪、太子参益气,熟地滋阴养血,大黄排毒降浊,汉防己行水,茯苓健脾利水,肉桂暖脾肾,通血脉;姜黄活血行瘀,忍冬藤清热解毒通络。诸药合用共奏解毒化瘀排浊,益气养阴健脾之功效。

近来研究证明,肿瘤坏死因子(TNF- α)可介导肾小球系膜细胞增殖^[3,4],本实验即以 TNF- α 诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖,然后以防己茯苓汤加减方进行干预,检测其细胞活性,分析其细胞周期,并检测其细胞培养液中 MMP-2 的含量。结果显示,防己茯苓汤加减方在一定程度上抑制了系膜细胞的增殖,且能增加 MMP-2 的表达而影响其细胞外基质 ECM 积聚,从而发挥其对慢性肾脏病的治疗作用。

[参考文献]

[1] 朱晓玲,王永钧,程晓霞,等.尿毒净 II 号对人肾系膜细胞增殖影响的实验研究[J].中国临床药理学与治疗学,2003,8(1):44-47.

[2] 徐金森.现代生物科学仪器分析入门[M].北京:化学工业出版社,2004.125-177.

[3] 杨立川,屈燧林,马行一,等.地塞米松抑制肿瘤坏死因子 α 介导的肾小球系膜细胞[J].华西药学杂志,2003,18(1):23-25.

[4] 周安宁,谌贻璞,高进.肿瘤坏死因子介导内皮素所致人肾小球系膜细胞增殖[J].北京大学学报(医学版),2001,33(6):529-531.