

· 博士之窗 ·

肾康注射液与苯那普利对肾小球系膜
基质作用的对比研究*郭立中¹ 刘玉宁² 毛 炜³ 叶传蕙² 顾 云¹ 周姗姗⁴

内容提要 **目的:**探讨肾康注射液与苯那普利对人肾小球系膜细胞外基质(ECM)不同成分的抑制作用强度。**方法:**采用体外培养的人肾小球系膜细胞技术,观察具有降逆泄浊、益气活血功效的中药肾康注射液及苯那普利对 ECM 不同成分的影响。**结果:**肾康注射液具有抑制 ECM 成分中纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)和Ⅳ型胶原(Col Ⅳ)的作用,该抑制作用具有一定的量效关系。苯那普利对 ECM 中 FN、Col Ⅳ也有一定的抑制作用,但不及肾康注射液作用明显。**结论:**肾康注射液对 ECM 的抑制作用优于苯那普利。

关键词 肾康注射液 苯那普利 系膜细胞 细胞外基质

Contrast Study on Effect of Shenkang Injection and Benazepril on Human Glomerular Mesangial Extracellular Matrix GUO Lizhong, LIU Yuning, MAO Wei, et al *Nanjing University of TCM, Nanjing (210029)*

Objective: To explore the intensity of inhibition of Shenkang Injection (SKI) and Benazepril on various ingredients of human glomerular mesangial extracellular matrix (ECM). **Methods:** Effect of SKI, a herbal preparation for lowering adverse Qi, dispelling turbidness, supplementing Qi and activating circulation, and Benazepril were observed by cultured glomerular mesangial cell technique in vitro. **Results:** SKI could inhibit the fibronectin, laminin, and type Ⅳ collagen of ECM, and the action was dose-dependent. Benazepril could also inhibit the fibronectin and type Ⅳ collagen of ECM but was weaker in intensity. **Conclusion:** The effect of SKI was superior to Benazepril in inhibiting ECM.

Key words Shenkang Injection, Benazepril, mesangial cell, extracellular matrix

肾小球疾病具有进行性加重的特征,而且各种类型的肾小球疾病发展的最终结果都表现为肾小球硬化的形成。肾小球硬化是多种原因引起肾小球损伤后出现的共同转归,是慢性肾功能衰竭(CRF)的主要病理基础。近年来,随着对肾小球硬化机制认识的不断深入,肾小球系膜细胞(MC)、细胞外基质(ECM)及各种细胞因子在肾功能进行性减退过程中所起的作用倍受关注。抑制 MC 增殖,减少 ECM 的堆积,拮抗细胞因子的不良作用,已成为防治肾小球硬化,延缓 CRF 病情进展的重要环节。本研究采用人肾小球 MC 体外培养技术,观察了具有降逆泄浊、益气活血功效的肾康注射液对 ECM 中纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)及Ⅳ型胶原(Col Ⅳ)含量的影响,并以苯那普利作为阳性对照,冀从细胞水平探讨其延缓肾小球硬化的作

用强度及作用机制。

材料与方法

1 材料

1.1 肾组织来源 系我校附属医院妇产科孕 5 月引产胎肾。

1.2 药物与试剂 肾康注射液(SKI)由大黄、丹参、红花等组成,成都中医药大学附属医院提供,每毫升含原生药 0.3g;苯那普利(Benazepril)由瑞士诺华制药有限公司生产,批号:012200;V 型胶原酶、HEPES 均系 Sigma 产品;RPMI 1640、胰蛋白酶、胰岛素均为美国 GIBCO 产品;小鼠抗人单克隆 FN 抗体、兔抗人 FN 多抗、羊抗兔 IgG-HRP 均购于北京中山生物技术有限公司;LN、Col Ⅳ放射免疫分析试剂盒,均购于上海海研医学生物技术中心。

1.3 主要仪器 CO₂ 孵箱(TYPE4 型)德国 HERAEUS 公司生产;倒置显微镜(TOKYO)日本 OLYMPUS 公司生产;洁净工作台(月坛牌)北京半导体设备一厂生产;酶标分析仪(MODEL2550)美国

* 本课题为国家中医药管理局资助项目(No. 92DO89),获国家中医药管理局科技进步一等奖

1. 南京中医药大学博士后流动站(南京 210029);2. 成都中医药大学;3. 广东省中医院;4. 武警南京医院

BTO-RAD 公司生产; FT-613 自动计数¹²⁵I 放免测量仪, 北京核仪器厂生产。

2 MC 培养与鉴定 无菌取胎肾, 分离提取肾皮质小球组织, 按照于力方等方法⁽¹⁾取去掉包裹的单个肾小球进行原代和继代培养, 实验中使用传代 5 代的 MC。培养的细胞经免疫病理鉴定证实为单纯的 MC, 无上皮细胞、肾小管细胞及成纤维细胞污染。

3 分组及 MC 上清的收集 吸取培养的第 5 代 MC 培养瓶中液体, 加胰酶 1ml, 置孵箱 (5% CO₂、37℃) 中消化 3min, 加 10% FCS 1640 终止液 2ml, 抽吸于离心管中, 800rpm, 离心 3min, 弃上清, 加 15% FCS 1640 培养液于离心管中, 吹打, 混匀。用计数板计数后, 倾入加样槽中, 用 8 导加样枪, 按每孔 200 μ l, 密度 4000/孔铺板。将 96 孔板按列从左至右依次分为空白对照组 (简称组 I)、苯那普利组 (简称组 II)、肾康注射液高浓度组 1、2 (简称组 III、组 IV)、肾康注射液低浓度组 1、2 (简称组 V、组 VI)、肾康注射液低浓度组 1、2 (简称组 VII、组 VIII), 共 8 组 (列), 每列 6 孔, 待细胞贴壁 24h 后, 每孔加无血清 1640 培养液 200 μ l 同步 24h。除空白对照组外, 其余各组分别依次加入苯那普利 10⁻³ mmol/L 及肾康注射液 100、50、25、12.5、6.25、3.125 μ g/ml, 待刺激 48h 后依次收集上清待测。

4 测定 ECM 中 FN 的含量 用双抗体夹心 ELISA 法, 0.5mg/ml 鼠抗人 FN 抗体原液用包被缓冲液稀释 1000 倍。取 96 孔板, 50 μ l/孔铺板, 4℃ 过夜, 甩去。用 PBS-吐温 20 洗涤液洗板 3 次, 每次 3min, 间隔 2min, 控干。每孔加 1% BSA 封闭液 100 μ l, 37℃, 1h 后甩去, 控干。依次按组各孔分别加入待测上清 50 μ l, 37℃, 3h 后甩去, 洗板 4 次后, 加兔抗人 FN 抗血清 (原液用 0.1% BSA·PBS1:1000 稀释) 50 μ l/孔, 室温放置 60min。加 HRP 羊抗兔 IgG (用 0.1% BSA·PBS 1:1000 稀释) 50 μ l/孔, 室温放置 50min。再洗板 4 次后, 每孔加入 OPD 显色液 50 μ l, 预热酶标仪, 用 2M H₂SO₄ 终止液 50 μ l/孔终止, 立即在 492nm 波

长读数, 并记录 OD 值。

5 ECM 中 LN、Col IV 含量的放射免疫法 (RIA) 测定 采用竞争法, 将缓冲液稀释 10 倍, 分别将¹²⁵I-LN、抗 LN 血清、¹²⁵I-Col IV、抗 Col IV 血清及二抗用缓冲液稀释, 将待测上清分别与¹²⁵I-LN、¹²⁵I-Col IV 及相应的抗血清混匀, 4℃ 过夜反应, 加二抗 4℃ 反应 60min, 离心 3500r/min 10min 弃上清,¹²⁵I 放射免疫测量仪计数。

6 统计学处理 数据均采用 SDAS 软件进行统计处理, 结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

结 果

肾康注射液与苯那普利对 ECM 成分含量的影响见表 1。表 1 所示, 在对 ECM 中 FN 含量影响方面, 肾康注射液组 (III~VIII 组) 与空白对照组 (I 组) 相比, 均有显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$); 说明肾康注射液除低浓度组 2 (VIII 组) 外, 其余各组对 FN 均有明显的抑制作用, 而且随着浓度的递增此作用更加明显, 并表现出一定的量效关系。实验还发现肾康注射液即使在极小浓度时对 ECM 中 LN 及 Col IV 的含量也有明显的抑制作用, 该抑制作用也呈现出一定的量效关系。从表 1 还可看出, 苯那普利组 (II 组) 在对 FN、Col IV 含量影响方面, 与空白对照组相比也有显著性差异 ($P < 0.01 \sim 0.05$); 但对 LN 影响方面, 两者比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 说明苯那普利对 ECM 中 FN、Col IV 也有一定的抑制作用, 但对 LN 其抑制作用不明显。另外, 从表中还可看出, 肾康注射液各浓度组 (III~VIII 组) 与苯那普利组相比, 在抑制 LN 方面也均有极显著性差异 ($P < 0.01$); 除肾康注射液低浓度组 2 (VIII 组) 外, 其余各组与苯那普利组相比, 在抑制 Col IV 方面也有显著性差异 ($P < 0.01 \sim 0.05$); 肾康注射液高浓度组 (III 组) 与苯那普利组相比, 在抑制 FN 方面也有显著性差异 ($P < 0.05$); 说明肾康注射液在抑制 ECM 中 FN、LN、Col IV 含量方面优于苯那普利。

表 1 肾康注射液与苯那普利对 ECM 成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	药物	FN(OD 值)	LN(ng/ml)	Col IV (μ g/ml)
I	6	—	0.337 $\pm$ 0.025	88.500 $\pm$ 2.739	29.667 $\pm$ 7.174
II	6	Benazepril 10 ⁻³ mol/L	0.295 $\pm$ 0.055 *	83.667 $\pm$ 6.088	17.000 $\pm$ 3.521 **
III	6	SKI 100 μ g/ml	0.252 $\pm$ 0.030 ** Δ	55.000 $\pm$ 6.325 ** Δ Δ	6.667 $\pm$ 1.033 ** Δ Δ
IV	6	SKI 50 μ g/ml	0.264 $\pm$ 0.028 **	56.833 $\pm$ 6.047 ** Δ Δ	7.667 $\pm$ 2.338 ** Δ Δ
V	6	SKI 25 μ g/ml	0.271 $\pm$ 0.031 **	58.167 $\pm$ 8.976 ** Δ Δ	8.833 $\pm$ 3.125 ** Δ Δ
VI	6	SKI 12.5 μ g/ml	0.280 $\pm$ 0.021 *	62.667 $\pm$ 5.086 ** Δ Δ	9.333 $\pm$ 3.933 ** Δ Δ
VII	6	SKI 6.25 μ g/ml	0.287 $\pm$ 0.019 *	72.000 $\pm$ 3.688 ** Δ Δ	10.500 $\pm$ 3.886 ** Δ
VIII	6	SKI 3.125 μ g/ml	0.333 $\pm$ 0.012 Δ	74.667 $\pm$ 1.966 ** Δ Δ	14.333 $\pm$ 4.083 **

注: 与 I 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 II 组比较, Δ $P < 0.05$, Δ Δ $P < 0.01$

讨 论

肾小球硬化时 ECM 的改变是近年来国内外肾脏病学者研究的热点之一,ECM 在肾小球内的蓄积,是肾小球硬化的主要特征性变化⁽²⁾。无论是免疫性或是非免疫性(如糖尿病)损伤引起的肾小球硬化过程中,FN 的变化早而明显,随后增多的是胶原,其中以 IV、V 型为主^(3,4)。因 Col IV 约占肾小球基底膜干重的 50%,且有人推测 LN 与 Col IV 的合成是独自进行的再各自形成网络状结构,然后相互产生作用⁽⁵⁾,故目前对肾小球硬化时 ECM 改变的研究主要集中在 FN、LN 及 Col IV 的变化上。体外培养证实,肾小球的三种固有细胞(MC、上皮细胞、内皮细胞)均能产生 ECM,其中以 MC 为最强⁽⁶⁾。肾小球 MC 属于肾脏血管周固有细胞,在正常情况下,MC 的数量、形态和位置保持相对稳定,其合成基质的能力也较小⁽⁷⁾。但在肾炎时常发生异常活动,造成 ECM 的大量产生与积聚⁽⁴⁾。所以如何减少系膜基质的扩张,降低 ECM 在肾小球内的蓄积在防治肾小球硬化机制探讨中占有十分重要的地位。

苯那普利是第四代血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)。现已证实,肾脏具有独立的肾素-血管紧张素系统(RAS),血管紧张素 II (Ang II) 是该系统最具有生物活性的因子。目前研究证实 Ang II 受体(ATR)至少有 I 和 II 两种亚型,其中 I 型受体(ATR_I)意义最大。该受体分布在肾小球 MC 上,与 Ang II、Ang III 有高度的亲和力⁽⁸⁾。进一步的研究还发现 ATR_I 占肾内 ATR 亚型分布的 90% 以上,Osborne 等在 10 余年前就报道动脉内注射³H 标记的 Ang II,发现³H-Ang II 只结合在肾小球系膜区,而不与肾血管、肾小管等部位结合。用¹²⁵I-Ang II 进一步实验发现光镜下¹²⁵I-Ang II 位于肾小球上,电镜下¹²⁵I-Ang II 颗粒在 MC 浆中⁽⁹⁾。血管紧张素转化酶是 RAS 中最后一级酶促反应的关键酶,用 ACEI 能够抑制 Ang II 的形成,可使循环和组织中的 Ang II 水平下降,且可直接降低肾内 Ang II 的生成量,从而对抗 Ang II 对肾脏的不良反应,减轻肾小球硬化的发生。大量的研究还证实,ACEI 除减轻肾小球的高灌注和高滤过作用外,还可通过阻断肾小球基底膜(GBM)上 Ang II 的特异作用的结合点,可使 GBM 固有的负电荷增多,并抑制 GBM 的进一步增厚,从而直接改善 GBM 的通透性⁽⁸⁾。目前体

内外动物实验还证实,ACEI 亦有抑制肾小球 MC 和系膜基质增生的作用,从而直接阻止肾小球硬化的形成⁽¹⁰⁾。近年来,临床上已成功地将 ACEI 用于各类肾脏病的治疗,发现在降低蛋白尿,阻止肾小球硬化方面具有一定的作用。

本实验结果表明,肾康注射液对 ECM 中 FN、LN、Col IV 的含量具有明显的降低作用,并呈现出一定的量效关系。苯那普利虽对 FN、Col IV 也有一定的抑制作用,但此抑制作用远不及肾康注射液明显。从而提示 MC 是肾康注射液发挥治疗作用的重要靶细胞,减轻 ECM 的积聚可能是肾康注射液延缓肾小球硬化的重要作用机制之一。值得注意的是,苯那普利主要是通过抑制 Ang II 的形成,减轻其对肾脏的损害,从而在阻止肾小球硬化方面发挥着重要作用,而肾康注射液是否对 Ang II 的形成也有一定的抑制作用,值得进一步深入探讨。

参 考 文 献

1. 于力方,陈香美,黎磊石. 正常人肾小球系膜细胞培养的研究. 中华肾脏病杂志 1990;6(2):70—74.
2. 孙喜元. 肾小球损害机理进展. 国外医学泌尿系统分册 1994;14(5):196—199.
3. Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. Am J Pathol 1991;139(4):889—891.
4. Floege J, Johnson RJ, Gorder K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. Kidney Int 1991;40(3):477—480.
5. Border WA. Extracellular matrix and glomerular disease. Seminars in Nephrology 1989;9:307—309.
6. 张月娥. 肾小球硬化发病机制研究进展. 中华病理学杂志 1994;23(1):4—6.
7. 李月娟. 体外培养的肾小球系膜细胞的形态、结构、间质合成功能及影响因素. 国外医学泌尿系统分册 1995;15(增刊):71—75.
8. Pfeilschifter J. Angiotensin II B-type receptor mediates phosphoinositide hydrolysis in mesangial cells. Eur J Pharmacol 1990;184(1):201—202.
9. Erdos EG, Skeldgel RA. Renal metabolism of Angiotensin I and II. Kidney Int 1990;supple 30:s24—s27.
10. Yoshida Y. Angiotensin converting enzyme inhibitor suppress accelerated growth of glomerular cells in vivo and invitro. Kidney Int 1988;33:296—298.

(收稿:1999-08-02 修回:1999-09-10)