

大黄素对狼疮性肾炎成纤维细胞生物学行为的影响*

刘冠贤¹ 叶任高² 谭志明¹ 钟伟强¹ 杨永铭¹ 张国强² 方敬爱³

内容提要 目的:观察中药大黄素(emodin)对狼疮性肾炎(LN)肾间质成纤维细胞生物学行为的影响。方法:将 LN 患者肾活检组织体外培养分离出成纤维细胞,分别用³H-TdR 掺入法和流式细胞术检测不同浓度的大黄素对人肾成纤维细胞增殖、凋亡及 c-myc 蛋白水平表达情况。结果:大黄素能明显抑制人肾成纤维细胞的分裂增殖,并通过促使 c-myc 蛋白高水平表达诱导细胞发生凋亡。结论:大黄素有抑制成纤维细胞增殖和促其凋亡的作用,从而达到减轻 LN 肾间质纤维化病变。

关键词 大黄素 成纤维细胞 增殖 凋亡 c-myc 蛋白

Effect of Emodin on Fibroblasts in Lupus Nephritis LIU Guanxian, YE Rengao, TAN Zhiming, et al. *Department of Nephrology, Huizhou Central People's Hospital, Guangdong (516001)*

Objective: To observe the effects of emodin on human fibroblasts in culture of kidney in patients with lupus nephritis (LN). **Methods:** Fibroblasts were isolated from culture of kidney of LN patients, and the effect of emodin on ³H-TdR incorporated rate of fibroblasts was observed. The apoptosis and c-myc gene expression were detected in the same time by flow cytometry. **Results:** Emodin could inhibit the proliferation of fibroblasts, and promote the programmed cell death through upregulate c-myc gene expression in human renal fibroblasts. **Conclusion:** Emodin can inhibit proliferation and promote apoptosis of fibroblasts, which may be important in ameliorate interstitial fibrosis, thus improving prognosis of LN.

Key words emodin, fibroblast, proliferation, apoptosis, c-myc protein

狼疮性肾炎(LN)尿毒症最重要的病理改变是肾间质纤维化,而成纤维细胞在肾间质纤维化发生发展中起重要的作用^[1]。因此,寻找对成纤维细胞生物学行为有影响的药物,将对防治 LN 肾间质纤维化、延缓尿毒症发生有重要的临床意义。大黄是临床治疗慢性肾功能衰竭(简称肾衰)的有效药物,为进一步探讨其作用机制,本研究观察了中药大黄的主要有效成分——大黄素(emodin)对肾间质成纤维细胞(Fibroblasts, Fbs)增殖、凋亡及 c-myc 蛋白水平表达的影响。

材料和方法

1 主要试剂和仪器 大黄素(上海医科大学药学院天然药物研究所研制,纯品);RPMI 1640 培养基(GIBCO 公司提供);胎牛血清(FCS,杭州四季青生物工程材料研究所提供);胰蛋白酶(1:250, Sigma 公司产品);³H-TdR(中国原子能科学研究院同位素研究所提供);乳酸脱氢酶(LDH)试剂(中外合资上海长征医

学科学有限公司提供);小鼠抗人 c-myc(sc-040)单克隆抗体(9E10,珠海基因科技有限公司提供);兔抗小鼠免疫球蛋白 FITC 结合(DAKO 公司产品);细胞凋亡检测试剂盒(华美生物工程公司);带计算机分析系统的流式细胞仪(Coulter Electronic 公司产品)。

2 细胞的分离培养 参照文献^[2]报告方法,将 LN 患者的肾活检组织(常规病理检查有间质纤维化者),体外分离培养出成纤维细胞,继续培养传代至足够数量。

3 细胞增殖检测 将上述 4~6 代成纤维细胞消化后,用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基配成 10⁵/ml 细胞密度的悬液,植入 96 孔(每孔 100μl)平底组织培养板。24h 后轻吸出原培养基,并用无血清 RPMI 1640 洗涤 2 次,然后分组培养(每组 6 个样板);对照组每孔加 2% FCS 的 RPMI 1640 培养基 100μl;低剂量组加含大黄素(250μg/ml)的等量上述培养基;高剂量组加含大黄素(500μg/ml)的等量上述培养基。继续培养 80h,在培养结束前 8h,每孔加入³H-TdR 0.1 μCi。在培养终点,每孔加入含 0.05% 胰蛋白酶和 0.1% EDTA 的消化液 100μl,5min 后用多头细胞收集

* 广东省医学科研基金资助课题

1. 广东省惠州市中心人民医院肾内科(广东 516001);2. 中山大学肾脏研究所;3. 山西医科大学第一附属医院肾内科

器将细胞收集于玻璃纤维滤纸, 烤干后进行闪烁计数。

4 c-myc 蛋白表达水平的检测 加入大黄素培养 2 天时, 从对照组、大黄素低剂量组和大黄素高剂量组分别收获 3 孔细胞, 制成单细胞悬液。经 4% 多聚甲醛固定 30min 后, 依次用 1:5 稀释度的鼠抗人 c-myc 蛋白单克隆抗体(第一抗体)和 1:5 稀释度的兔抗鼠 IgG-FITC 荧光抗体(第二抗体)各孵育 30min, 用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后, 经流式细胞术检测 c-myc 蛋白表达情况。

5 细胞凋亡检测 将 6~8 代成纤维细胞以 $10^5/\text{ml}$ 密度植入 6 孔平底组织培养板, 在含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中预先培养 48h, 吸去原培养液, 然后分组(每组 6 个样板): 对照组仅加上述培养基; 低剂量组加含大黄素($250\mu\text{g}/\text{ml}$)的上述培养液; 高剂量组加含大黄素($500\mu\text{g}/\text{ml}$)的上述培养基。每孔所加培养基均为 1ml。继续培养, 用倒置相差显微镜观察细胞形态变化。在药物干预 5 天和 7 天时, 每组分别收获 3 孔细胞, 制成单细胞悬液; 按文献^[3]介绍方法做 PI 染色, 用流式细胞术(FCM)检测凋亡细胞(用平均每分钟计得的细胞数量表示, 即细胞计数/min)。PI-DNA 复合物发出的荧光, 经 FCM 计量分析, 可得到细胞 DNA 含量分布的直方图。由于细胞发生程序性死亡时 DNA 片段性碎裂, 其 DNA 含量小于正常二倍体 DNA 含量, 故细胞 DNA 含量分布的直方图中, 亚二倍体峰(Hypodiploid peak)代表凋亡细胞和细胞碎片。

6 LDH 活性检测 细胞坏死时胞内 LDH 释放入培养基中, 而细胞凋亡则不会。因此, 检测培养基中 LDH 活性, 可以反映细胞坏死的水平。在上述细胞凋亡实验中收集细胞时, 将培养基吸出, 并经 200r/min, 离心 5min, 取上清液 0.05ml, 加入已在 30°C 预温的 3ml LDH-L 试剂中混匀, 通过分光光度计检测吸光度, 从而计算培养基中 LDH 活性。

7 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均值之间差别检验以 t 检验分析。流式细胞术检测结果由相应软件统计分析。

结 果

1 大黄素对成纤维细胞增殖的影响 低剂量组和高剂量组大黄素的 ^3H -TdR 掺入量分别为对照组的 $(75.7 \pm 7.4)\%$ ($P < 0.05$) 和 $(31.6 \pm 5.4)\%$ ($P < 0.01$)。提示大黄素对 LN 患者肾间质成纤维细胞的增殖有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖性。

2 大黄素对 c-myc 蛋白表达的影响 加入大黄

素培养 2 天时, 对照组、大黄素低剂量组和大黄素高剂量组($n = 3$)细胞 c-myc 蛋白阳性率分别是 4.6%、11.7% 和 14.2% (与对照组比较, 均 $P < 0.05$), 提示大黄素可诱导 c-myc 蛋白表达水平上调。

3 大黄素对成纤维细胞凋亡的影响 在倒置相差显微镜下观察, 加入药物 5 天时, 大黄素低剂量组和大黄素高剂量组的细胞已有明显的凋亡形态学改变, 包括细胞轻度固缩, 胞核碎裂及凋亡小体形成(凋亡小体指较大的凋亡细胞以出芽方式脱落的部分)。7 天时, 上述改变更显著。对照组则无明显上述改变。这些细胞的凋亡, 在流式细胞术的检测得到证实, 大黄素低剂量组干预第 5 天、第 7 天细胞发生凋亡的百分数为 26.7%、63.2%; 大黄素高剂量组依次为 32.3%、68.3%; 对照组依次为 5.6%、12.3%。大黄素低剂量组、大黄素高剂量组与对照组比较有显著性差异(均 $P < 0.01$)。表明大黄素可促进 LN 患者肾间质成纤维细胞凋亡。

4 培养基中 LDH 活性 对照组和大黄素低剂量组、大黄素高剂量组培养基中 LDH 活性(u/L)分别为 118 ± 14 、 115 ± 12 和 120 ± 15 , 比较无显著性差异($P > 0.05$)。证实大黄素促使细胞死亡是细胞凋亡而非坏死的方式进行。

讨 论

肾间质纤维化是导致尿毒症的重要因素, 而成纤维细胞是参与形态发生、重建和组织损伤修复的一种重要的间质细胞, 其异常的增殖和凋亡与肾间质纤维化及疤痕形成密切相关。特别是细胞凋亡这一生物学行为, 在肾脏炎症细胞成分的调节中起重要的作用^[4]。LN 患者的肾活检中, 肾间质每有明显病变, 常见疤痕形成(肾间质纤维化的结果), 其数量的多少, 直接影响着 LN 患者的治疗效果和预后。从大黄中提纯的蒽醌类衍生物, 主要包括大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和大黄酚等 5 种成分, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤及解毒等药理作用^[5]。文献报告大黄素可抑制肾小球系膜细胞中增殖的细胞核抗原核蛋白的表达^[6]。本研究结果发现, 大黄素对 LN 患者肾间质成纤维细胞增殖有明显的抑制作用, 在一定的药物浓度范围内, 这种抑制作用呈剂量依赖性, 药物浓度越高, 抑制作用越明显。

越来越多的资料证明细胞凋亡异常与 LN 发生发展有密切的关系。大黄素抑制人肾成纤维细胞增殖和促其凋亡的机理, 目前尚不清楚。c-myc 蛋白是人类原癌基因 c-myc 编码的一种 DNA 相关核蛋白, 它与细

细胞增殖、分化和凋亡的调控有关。一般认为,调控细胞凋亡的基因或其产物主要分三大类:(1)能诱导、启动或刺激凋亡的野生型 P53;(2)能特异性抑制凋亡并直接参与细胞增殖与生存的抑制基因(bcl-2);(3)对 P53 和 bcl-2 的调控起协同或增强双重作用的 c-myc。研究发现细胞凋亡调节中的 bcl-2 过度表达的转基因小鼠,可产生免疫复合物性 LN。临床研究表明, LN 患者外周血淋巴细胞 bcl-2 表达增高⁽⁷⁾。本实验提示大黄素能使 LN 肾间质成纤维细胞 c-myc 蛋白表达水平上调,可能通过 P53 而拮抗 bcl-2 的效应,最终中止细胞增殖而凋亡。从流式细胞术的结果判断,大黄素在干预第 5 天和第 7 天时均出现明显细胞凋亡现象,从而证实大黄素能促进 LN 肾间质成纤维细胞凋亡,导致其细胞生存数量减少,其作用效应亦呈剂量依赖性。

中医学对 LN 病因病机的认识尚未见诸文献经典,我们认为本病外因为毒邪侵入,内因为正气不足,阴阳气血失调,导致毒邪内蕴于脏腑经络,血脉凝滞,致成瘀热,而瘀血阻滞又是其病理改变的关键一环⁽⁸⁾。近年文献报告,大黄素能使血浆血栓素 B₂ (TXB₂) 明显抑制, 6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 合成增加, TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 比值下降,血小板最大聚集率和聚集速度均显著降低,提示其有改善微循环、抗凝、抗血栓等作用⁽⁹⁾。

综上所述,大黄素不仅可抑制成纤维细胞分裂增殖,而且可通过促使 c-myc 蛋白高水平表达诱导细胞发生凋亡。此外,大黄素的改善微循环等作用,均可能

是其取得临床疗效的重要机理之一。因此,进一步表明大黄是治疗 LN 及其他慢性肾炎的间质纤维化病变、延缓尿毒症发生的理想药物。

参 考 文 献

1. 李文歌. 成纤维细胞与肾间质纤维化. 国外医学泌尿系统分册 1995;15:167—169.
2. Rodemann HP, Muller GA. Characterization of human, renal fibroblasts in health and disease: II In vitro growth, differentiation and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. Am J Kidney Dis 1991;17:684—686.
3. Elstei KH, Zucker RM. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulation. Exp Cell Res 1994;211:322—323.
4. John Savill. Apoptosis: A mechanism for regulation of the cell complement of inflamed glomeruli. Kidney Int 1992;47:607—612.
5. 西冈五夫. 大黄的生物活性及其有效成分. 国外医学中医中药分册 1986;8(3):27—30.
6. 刘志红, 胡伟新, 黎磊石, 等. 大黄素对肾脏系膜细胞增殖细胞抗原的影响. 肾脏病与透析肾移植杂志 1993;2:45—48.
7. 叶任高, 孙 林. 进一步开展中西医结合对狼疮性肾炎的研究. 中国中西医结合杂志 1997;17(3):177—178.
8. 魏练波, 刘冠贤主编. 叶任高肾脏病临床备要. 北京: 人民卫生出版社, 1997:183—190.
9. 高晓山, 陈馥馨. 为了全人类健康用好大黄. 中西医结合杂志 1990;10(12):754—757.

(收稿:1999-01-20 修回:1999-05-20)

第四次全国中西医结合实验医学

学术研讨会征文通知

为促进中医、中西医结合实验医学水平的提高, 拟于 2000 年 7 月在长春市召开第四次全国中西医结合实验医学学术研讨会。现将有关征文事项通知如下。(1)征文内容: 中西医结合规范实验室的研讨; 中西医结合实验室操作规程(SOP)的研究; 中西医结合临床实验研究; 中西医结合基础实验研究; 中西医结合实验医学研究的新思路、新方法; 中西医结合实验医学研究文献的整理、综述; 临床检验指标在中西医结合研究中的应用; 各种高、新技术在中西医结合研究中的应用; 各种中医证型实验动物模型的制造、应用。(2)论文要求: 论文一律用打印稿, 抄写者字迹清楚。字数在 3000 字内, 并附 500 字以内摘要 1 份。注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码, 并附单位介绍信或盖单位印章, 主办单位将与有关公开出版的杂志联合出版增刊, 符合要求的论文均给予发表。会议代表发给国家级继续教育学分证书及论文证书。(3)截稿日期: 2000 年 4 月 30 日, 以邮戳为准。邮寄地址: 长春中医学院附属医院 杨世忠收,

邮编:130021, 联系电话:0431—5625530。

第五次全国中西医结合呼吸病

学术交流会议征文通知

为进一步推动全国中西医结合呼吸病防治的深入研究及普及工作, 中国中西医结合学会呼吸病专业委员会计划于 2000 年 9 月在江西南昌召开全国呼吸病学术交流会, 本届会议上拟制定支气管哮喘的中西医结合诊断、辨证分型及治则方案。现将有关征文事宜通知如下。(1)征文内容: 包括支气管哮喘防治及诊断分型、治则统一方案判定的意见、慢性阻塞性肺病、肺心病、肺间质纤维化、肺癌等与呼吸病诊断、治疗、预防、护理有关的中医、中西医结合方面的论文。(2)征文要求: 未在杂志上公开发表, 全文 4000 字以内 1 份, 500 字以内的摘要 2 份。请寄打印文稿(并附软盘, 应用 word 文件)或用 400 字稿纸抄写。论文截止时间为 2000 年 5 月 31 日。请自留底稿, 恕不退稿。(3)征文送交地点: 北京西苑操场 1 号中国中医研究院西苑医院呼吸科, 邮政编码: 100091。联系人: 张京安 张燕萍。电话: (010)62875599—6201 或 6202。