

大黄素对人肾成纤维细胞增殖的影响

宁英远¹ 王俭勤² 屈遂林³

内容提要 目的:研究大黄素对人肾成纤维细胞增殖的影响。方法:在体外人肾成纤维细胞培养的基础上,采用³H-TdR 掺入法观察了不同浓度大黄素(10、30、50、80、100 μg/ml)对人肾成纤维细胞³H-TdR 掺入率的影响。同时,利用流式细胞仪观察了大黄素(10、50、100 μg/ml)对细胞周期的影响。结果:大黄素以剂量依赖方式降低了人肾成纤维细胞³H-TdR 掺入率($r=0.995$, $P<0.01$)。大黄素(50 和 100 μg/ml)抑制了人肾成纤维细胞细胞周期的进程($P<0.01$)。结论:大黄素通过抑制细胞 DNA 合成,延迟细胞周期的进程,抑制了细胞增殖,这一结果为大黄素的临床应用提供了部分实验依据。

关键词 大黄素 肾间质 成纤维细胞 细胞增殖

Effect of Emodin on Human Kidney Fibroblast Proliferation NING Yingyuan, WANG Jianqin, QU Suilin
The Second Affiliated Hospital of Lanzhou Medical College, Lanzhou (730030)

Objective: To study the effect of emodin on proliferation of human kidney fibroblasts in vitro. **Methods:** After human kidney fibroblasts were cultured, isolated and identified, both the effects of five different concentrations of emodin (10, 30, 50, 80 and 100 μg/ml) on ³H-TdR incorporation, and the effects of three different concentrations of emodin (10, 50 and 100 μg/ml) on cell cycle by flow cytometry were investigated. **Results:** The exposure of human kidney fibroblasts to emodin (10 ~ 100 μg/ml) caused a dose-dependent reduction in ³H-TdR ($r=0.995$, $P<0.01$), and could delay the progress of human kidney fibroblasts from G₁ to S phase. **Conclusions:** Emodin inhibited the proliferation of human kidney's fibroblasts by inhibiting the cell DNA synthase and delaying the progress of cell cycle. These findings might provide part of experimental basis for the clinical use of emodin.

Key words emodin, renal interstitial tissue, fibroblast, cell proliferation

肾间质纤维化是各种原因造成小管间质病变的最终结果,是导致慢性肾功能衰竭的主要原因^[1]。成纤维细胞作为肾间质的主要重构细胞,在肾间质纤维化中有重要作用^[2]。因此,寻找药物抑制其增殖,减少胞外基质的产生成为预防肾间质纤维化的重要措施,本研究观察了大黄素对人肾成纤维细胞增殖的影响。

材料和方法

1 药物 大黄素系成都中医药大学分析测试中心从大黄中提取配制而成的,纯度大于 90%。

2 主要试剂和仪器 DMEM/F₁₂ 培养基(Gibco),小牛血清(华西医科大学生化教研室),³H-TdR(中国原子能研究所),ELITE ESP 型流式细胞仪(Coulter),FJ-2107P 液闪计数器。

3 体外人肾成纤维细胞的培养 按文献^[3,4]方法

进行。在无菌条件下将富含小管间质的肾组织(取材于肾移植供肾未用者)剪切成 1 mm × 1 mm 小块, Hank 氏液洗涤后接种于培养瓶内,培养液为含 20% 小牛血清的 DMEM/F₁₂。培养基培养的细胞经鉴定符合纤维细胞形态特征,90% 以上的细胞 VIII 因子表达阴性^[3]。鉴定后的人肾成纤维细胞传代至足够数量后进行下列实验。

4 肾成纤维细胞增殖的检测 用含 10% 小牛血清的 DMEM/F₁₂ 调细胞密度 2×10^4 /ml,接种于 96 孔的培养板,培养 24h 后换液并分别加入不同浓度的大黄素(10、30、50、80、100 μg/ml),对照孔只加 10% 小牛血清的 DMEM/F₁₂,每一浓度设 5 个复孔。继续培养 18h 后每孔加入³H-TdR 0.5 μCi,6h 后收集细胞于纤维滤纸上,晾干后加闪烁液 5 ml,在液闪计数器下计录每孔 cpm 值。

5 细胞周期的检测 同样方法调细胞浓度为 7×10^4 接种于 25 ml 细胞培养瓶内,每浓度调 3 瓶。24h 后换液,并加入不同浓度的大黄素(10、50、100 μg/ml)。对照瓶不加大黄素。继续培养 24h 后,0.025%

1. 兰州医学院附属第二医院(兰州 730030); 2. 中山医科大学;
3. 华西医科大学附属第一医院

胰蛋白酶 0.01 % EDTA 消化, Hank 氏液洗涤, 75 % 乙醇固定, 再调细胞密度为 $1 \times 10^6 / \text{ml}$, 碘化丙啶染色, 尼龙网过滤, 流式细胞仪下检测 G_1 、S、 G_2 和 M 期细胞百分数。

6 统计分析 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用方差分析。相关关系用直线相关分析。

结 果

1 大黄素对人肾成纤维细胞³H-TdR 掺入率的影响 见表 1。与对照组比较, 大黄素在 $30 \mu\text{g} / \text{ml}$ 时即明显降低了成纤维细胞³H-TdR 掺入率($P < 0.01$), 其后随剂量增加抑制效应增强($r = -0.995$, $P < 0.01$)。

表 1 大黄素对人肾成纤维细胞³H-TdR 掺入率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	³ H-TdR 掺入率(cpm)
对 照	5	2894.6 ± 154.8
大黄素 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$	5	2796.3 ± 108.4
$30 \mu\text{g} / \text{ml}$	5	$2564.8 \pm 90.5^*$
$50 \mu\text{g} / \text{ml}$	5	$2118.5 \pm 46.8^*$
$80 \mu\text{g} / \text{ml}$	5	$1761.9 \pm 79.8^*$
$100 \mu\text{g} / \text{ml}$	5	$1389.4 \pm 91.7^*$

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

2 大黄素对人肾成纤维细胞细胞周期的影响 见表 2。与对照组比较, 大黄素在 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 时对 G_1 、S 期细胞百分数无明显影响($P > 0.05$), 在 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 和 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ 时均明显增加了 G_1 期细胞百分数, 降低了 S 期细胞百分数($P < 0.01$)。

表 2 大黄素对人肾成纤维细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	细胞周期(%)		
		G_1	S	$G_2 + M$
对 照	3	59.0 ± 0.5	22.7 ± 1.2	18.1 ± 0.8
大黄素 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$	3	58.6 ± 1.5	21.4 ± 0.5	17.7 ± 1.2
$50 \mu\text{g} / \text{ml}$	3	$64.3 \pm 1.1^*$	$14.7 \pm 1.2^*$	17.8 ± 2.3
$100 \mu\text{g} / \text{ml}$	3	$74.3 \pm 1.1^*$	$11.4 \pm 0.5^*$	16.3 ± 0.7

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

大黄素为中药大黄的活性成分, 其结构为 1, 6, 8-三羟基-3-4 甲基蒽醌。最近报道, 大黄素能抑制肾系膜细胞增殖细胞核抗原的表达⁽⁵⁾。成纤维细胞作为肾间质的主要重构细胞, 在肾间质纤维化中有重要作用, 大黄素能否抑制其增殖, 进而减少胞外基质蛋白的过度产生, 防治肾间质纤维化。本研究对此进行观察,

结果表明, 大黄素能以剂量依赖方式降低体外培养的人肾成纤维细胞³H-TdR 掺入率, 亦即抑制了细胞 DNA 的合成, 从而抑制了细胞增殖。细胞增殖是通过细胞周期实现的, 目前已知在 G_1 期和 S 期或 G_2 期与 M 期之间存在着影响细胞周期的调控点, 一旦细胞通过此调控点, 则药物再也不能阻止其进入或通过 S 期向 M 期转化。本研究采用流式细胞仪观察了大黄素对细胞周期的影响, 结果表明大黄至少在 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 和 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ 时均增加了 G_1 期细胞百分数, 降低了 S 期细胞百分数, 使细胞受阻于 G_1 期, 延迟 G_1 期细胞向 S 期转化, 抑制了细胞增殖。

大黄素对细胞增殖的抑制作用可能与其钙通道阻滞作用有关⁽⁶⁾。钙是细胞内重要的信使物, 适宜的胞内外钙浓度为细胞增殖所必须, 可能由于大黄素的钙通道阻滞作用, 使钙内流障碍, 使细胞周期各调节因子间信号传递障碍, 引起细胞周期的改变⁽⁷⁾, 延迟了细胞周期的进程, 阻抑了细胞增殖。

大黄素抑制人肾成纤维细胞增殖可能是中药大黄素延缓慢性肾功能衰竭的机理之一。这一结果为大黄素的临床应用提供了部分实验依据。

参 考 文 献

1. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progress of renal damage. Am J Kid Dis 1992;20: 1—17.
2. Muller GA, Strutz FM. Renal fibroblast heterogeneity. Kidney Int 1995;50: 33—36.
3. 张国强, 叶任高, 陈少雄, 等. 间质纤维化人肾成纤维细胞的异常生长与凋亡. 肾脏病透析与移植杂志 1996;37: 5—8.
4. Lonnemann G, Shapiro L, Engler-Blum G, et al. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. Kidney Int 1995;47: 837—844.
5. 刘志江, 胡伟新, 黎磊石, 等. 大黄素对肾脏系膜细胞增殖细胞核抗原表达的影响. 肾脏病透析与移植杂志 1993;2: 45.
6. 林秀珍, 马德禄, 崔荣芬. 大黄素、番泻甙及大黄多糖对培养大鼠肝细胞内游离钙浓度的影响. 中国中西医结合杂志 1995;15(7): 419—421.
7. Short Ad, Bian J, Ghosh TK, et al. Intracellular Ca^{2+} pool content is linked to control of cell growth. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90: 4986—4990.

(收稿: 1998-10-10 修回: 1999-05-20)