

· 论著 ·

肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC- PK₁ 分泌IV型胶原的影响赵宗江¹,张新雪¹,傅博²,陈香美²,叶传蕙³,牛建昭¹,李明权³

(1. 北京中医药大学,北京 100029, 2 解放军总医院,北京 100853

3. 成都中医药大学,四川 成都 610075)

摘要:目的:探讨肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC- PK₁ 分泌IV型胶原(CoIV)的影响。方法:用细胞酶联免疫吸附法(ELISA),以单味大黄注射液为实验对照组,检测肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC- PK₁ 分泌 CoIV 含量的影响。结果:肾康注射液可以显著抑制肾小管上皮细胞 LLC- PK₁ 分泌 CoIV 的含量,并呈剂量依赖关系;肾康注射液作用明显优于同等含量的单味大黄注射液。结论:肾康注射液抑制肾小管上皮细胞 LLC- PK₁ 分泌 CoIV 含量,是该中药复方延缓慢性肾功能衰竭进展的机制之一。

关键词:肾康注射液;肾小管上皮细胞;LLC- PK₁;IV型胶原;中医药

中图分类号: R334.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008- 9691(2000)04- 0200- 03

The effects of Shenkang injection(肾康注射液) on the collagenIV of LLC- PK₁ renal tubular epithelial cells

ZHAO Zong- jiang, ZHANG Xin- xue, FU Bo, et al.¹ Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029

Abstract Objective To study the effects of Shenkang injection(肾康注射液) on the collagenIV (CoIV) of LLC- PK₁ renal tubular epithelial cell. **Methods** Using enzyme- linked immunosorbent assay(ELISA) to observed the effects of Shenkang injection on the CoIV of LLC- PK₁ renal tubular epithelial cells, in contrast group treated with the injection that was extracted from Rheum officinale Baill. **Results** CoIV of LLC- PK₁ renal tubular epithelial cell was inhibited by Shenkang injection, and those actions were dose- dependent, more remarkable than that of the injection that was extracted from Rheum officinale Baill. **Conclusions** The mechanism of delaying chronic renal failure with Shenkang injection is achieved by inhibiting CoIV of LLC- PK₁ renal tubular epithelial cell.

Key words Shenkang injection; renal tubular epithelial cell; LLC- PK₁; collagenIV, traditional Chinese medicine

CLC number: R334.1 **Document code** A **Artical ID:** 1008- 9691(2000)04- 0200- 03

慢性肾功能衰竭(CRF)时,肾小管上皮细胞处于高代谢状态,一方面导致自身损伤,另一方面使其过度合成和分泌细胞外基质(ECM),尤其是IV型胶原(CoIV)大量增加,直接参与肾间质纤维化的形成,最终导致肾功能的持续恶化。具有化瘀泄浊、益气固本功效的肾康注射液,治疗CRF有较好的临床疗效^[1]。为探讨其延缓CRF的作用机制,本实验以单味大黄注射液为实验对照组,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定了肾康注射液对猪近端肾小管上皮细胞株(LLC- PK₁细胞)分泌CoIV的影响

1 材料与方法

1.1 材料: LLC- PK₁细胞购自美国ATCC公司。肾康注射液(简称肾康),每毫升相当生药0.3g,大黄注射液(简称大黄),每毫升相当生药0.05g,均为成都中医药大学附属医院制剂室提供。主要试剂: RPMI- 1640培养基,普通胰素,胰蛋白酶(美国GIBC公司产品); HEPES(美国Sigma公司产品); 小牛血清(FCS,天津血液病研究所产品); 明胶(日本和光纯药工业株式会社产品); 邻苯二氨(DAB), EDTA·2Na(美国Serva公司产品)。兔抗人CoIV抗体,辣根过氧化物酶标(HRP)羊抗兔IgG(北京中山生物技术有限公司产品)

1.2 实验方法:

1.2.1 细胞复苏与同步: 取冻存于液态氮中的80代LLC- PK₁细胞,迅速用双手揉搓至冰水状,然后吸入10ml离心管中,加RPMI- 1640 5ml,离心,

基金项目: 国家中医药管理局科研基金资助项目

获奖项目: 国家中医药管理局科技进步一等奖(92D089)

作者简介: 赵宗江(1960-),男(汉族),河北阜平人,博士,讲师。目前为北京中医药大学中西医结合博士后,研究方向为中西医结合中医药防治器官(肝、肾等脏器)纤维化的基础实验研究。已发表论文18篇,参编、主编专著7部。

弃上清液,加 10% FCS RPMI- 1640,平分于 2个 5 ml 细胞培养瓶中,孵箱孵育 72小时,待细胞融合 80% 以上时,胰酶消化、离心,用计数板计数,按每孔 10% FCS RPMI- 1640 2.5×10^5 个细胞种植于 96 孔培养板上,4块复板,每板 60孔,周围孔加同等剂量生理盐水 孵育 24小时,待细胞完全贴壁后,吸出培养液,换 RPMI- 1640液每孔培养,使细胞静止于 G₀ 期

1.2.2 分组与加刺激物:将 96孔培养板按每行前 8复孔各为 1组,最后 2列 12复孔为 1组,即空白对照组 LPS对照组 大黄及不同浓度肾康组,共 7组 甩去板中残液后,分别施加各种刺激因素,每孔 200 μ l 各组实验条件见表 1 除空白对照组外,其余各组加入相应浓度刺激物后,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育箱培养

表 1 肾康对体外培养 LLC- PK₁ 细胞分泌 CdV 的影响的实验方法

组序	名称	实验方法
I 组	空白对照组	2% FCS RPMI- 1640
II 组	LPS对照组	2% FCS RPMI- 1640+ LPS 1 mg/L
III组	肾康低浓度组	2% FCS RPMI- 1640+ LPS 1 mg/L+ 肾康 0.5 g/L
IV组	肾康中浓度 1组	2% FCS RPMI- 1640+ LPS 1 mg/L+ 肾康 1.0 g/L
V 组	肾康中浓度 2组	2% FCS RPMI- 1640+ LPS 1 mg/L+ 肾康 2.0 g/L
VI组	大黄组	2% FCS RPMI- 1640+ LPS 1 mg/L+ 大黄 0.7 g/L
VII组	肾康高浓度组	1% FCS RPMI- 1640+ LPS 1 mg/L+ 肾康 4.0 g/L

1.3 ELISA测定 CdV 含量^[2]:分 12 24 48和 60 小时等 4个时间点,每个时间点结束时,甩去培养上清,用 1% 多聚甲醛固定细胞,1% 牛血清白蛋白 (BSA)封闭非结合区域,加兔抗人 CdV 抗体 (1: 1 000稀释),用 PBS- Tween- 20洗,加 HRP-羊抗兔 IgG (1: 1 000稀释),再用 PBS- Tween- 20洗,加 DAB+ H₂O₂,避光,每孔加入 H₂SO₄ 2 mol/L 终止,在 492 nm 处测吸光度 (A)值。

1.4 统计学方法:数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均采用 SDAS 统计软件进行统计学处理,组间比较用 t 检验

表 2 肾康对体外培养 LLC- PK₁ 细胞分泌 CdV 含量 (A 值) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	刺激因素	12小时 A 值	24小时 A 值	48小时 A 值	60小时 A 值
I 组		0.165 8 \pm 0.004 6	0.166 3 \pm 0.005 3	0.167 0 \pm 0.003 3	0.201 0 \pm 0.005 4
II 组	LPS 1 mg/L	0.166 1 \pm 0.004 9	0.170 1 \pm 0.003 9	0.187 2 \pm 0.010 2	0.202 9 \pm 0.004 8
III组	LPS 1 mg/L+ 肾康 0.5 g/L	0.163 7 \pm 0.003 2	0.148 1 \pm 0.004 0	0.149 5 \pm 0.003 2	0.174 1 \pm 0.003 6
IV组	LPS 1 mg/L+ 肾康 1.0 g/L	0.158 5 \pm 0.003 8	0.140 2 \pm 0.002 4	0.148 2 \pm 0.003 0	0.159 5 \pm 0.005 9 * *
V 组	LPS 1 mg/L+ 肾康 2.0 g/L	0.156 4 \pm 0.006 9	0.142 0 \pm 0.004 9	0.142 7 \pm 0.003 1	0.156 1 \pm 0.004 7 * * ☆
VI组	LPS 1 mg/L+ 大黄 0.7 g/L	0.151 5 \pm 0.002 2	0.143 8 \pm 0.003 8	0.142 6 \pm 0.012 8	0.154 2 \pm 0.002 0 * * ☆
VII组	LPS 1 mg/L+ 肾康 4.0 g/L	0.146 0 \pm 0.005 3	0.130 9 \pm 0.005 2 *	0.139 5 \pm 0.003 1 * * ☆ ☆ □	0.133 6 \pm 0.004 5 * * ☆ ☆ □

注:与 II 组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与 III 组比较: * P < 0.05; 与 IV 组比较: ☆ P < 0.05; 与 V 组比较: * P < 0.05; 与 VI 组比较: □ P < 0.05

2 结果

不同时间点肾康对体外培养 LLC- PK₁ 细胞分泌 CdV 含量的影响见表 2 结果表明,肾康对体外培养 LLC- PK₁ 细胞分泌 CdV 的影响在 12 小时作用不明显,24 小时开始起效,60 小时不同浓度肾康组显示有良好的量效关系,肾康组明显优于同等剂量大黄组。说明肾康对体外培养 LLC- PK₁ 细胞分泌 CdV 有显著抑制作用。

3 讨论

在既往 CRF 的研究中,大量的动物实验及临床观察都集中在肾小球病变上,认为是由于肾小球的严重病变所致,而对肾小管、间质病变重视不够。近年来越来越多的资料显示,肾小管、间质病变在 CRF 中起着十分重要的作用,是决定预后的更为重要的因素^[3]。肾间质纤维化是各种原因造成的肾小管及间质病变的最终结果,也是导致 CRF 的主要原因之一。当 CRF 时,由于长期缺血或滤过的血浆蛋白造成肾小管损伤,细胞功能障碍,受损的肾小管上皮细胞可产生大量细胞因子如转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍化生长因子 (PDGF)、白介素-6 (IL-6)、IL-8 和表皮生长因子 (EGF)^[4]。而这些细胞因子可促使成纤维细胞增殖、细胞外基质 (ECM) 合成增加,尤其是 CdV 分泌增加,直接导致了肾间质纤维化的形成及 CRF 进程加速。

本实验动态观察了肾康注射液对肾小管上皮细胞产生 CdV 的影响。结果发现各组肾小管上皮细胞分泌 CdV 含量随时间而增加,而肾康注射液可以显著抑制 CdV 的分泌,第 12 小时作用不明显,24 小时开始起效,60 小时不同浓度肾康组显示有良好的量效关系,且肾康注射液组作用明显优于同等剂量大黄组,说明肾康注射液药物之间有协同作用,发挥了多种成分、多个靶点作用的优势。这一结果提示,肾康注射液延缓 CRF 进展的作用机制可能是通过抑制肾小管上皮细胞肥大、缓解细胞高代谢状态、减

少细胞因子释放和抑制 CdV 的分泌而实现的

(致谢: 本课题在解放军总医院肾脏病重点实验室完成, 并得到了叶一舟技师、李文歌博士和刘述文主治医师等的悉心指导。在此谨表谢忱。)

参考文献:

[1] 叶传蕙, 王安娜, 叶学锋, 等. 中药肾康注射液及栓剂治疗慢性肾功能衰竭临床及实验研究. 首届国际中西医结合肾脏病学术会议, 杭州, 1994. 14-16.

[2] Marui N, Offermann M K, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and

expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 1993, 92(4): 1866-1874.

[3] 吴燕, 杨俊伟. 慢性肾脏病进展中小管间质纤维化的发生机理及治疗原则. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1995, 4(4): 337-342.

[4] Ong A C M, Fine L G. Tubular-derived growth factor and cytokins in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: implication for human renal disease progression. *Am J Kidney Dis*, 1994, 23(2): 205-209.

(收稿日期: 2000-05-11 修回日期: 2000-06-19)

(本文编辑: 李银平)

· 经验交流 ·

黄芪当归治疗难治性肾病综合征(附 51例临床分析)

阎晓勇, 杨秀伟, 朱启刚, 蔡彦敏

(山东省单县中心医院急救中心, 山东 单县 274300)

中图分类号: R692 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2000)04-0202-01

1996年4月~1999年2月, 采用黄芪、当归辅以五联疗法治疗难治性肾病综合征(肾综)51例, 报告如下。

1 病例与方法

1.1 病例: 难治性肾综 51例中原发性肾综 34例, 过敏性紫癜肾炎 12例, 狼疮肾炎 5例。其中男 30例, 女 21例; 年龄 12~64岁, 平均 35.6岁, 病程 4个月~3年。全组患者均经过至少 6个月的正规泼尼松疗法, 并用潘生丁、卡托普利或采用传统五联疗法(泼尼松、潘生丁、卡托普利、环磷酰胺、肝素)治疗, 临床症状无好转或好转后又复发而转我科。用泼尼松治疗每日 60 mg 8周, 水肿、蛋白尿无改善; 严重低蛋白血症及顽固性腹水, 且对肾上腺皮质激素及免疫抑制剂药物疗效不佳。

1.2 治疗方法: 采用黄芪、当归合用五联疗法: ①黄芪 40 g, 当归 20 g, 水煎 500 ml, 分早晚各 1次口服, 4周为 1个疗程。②泼尼松 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 早晨 1次顿服; 潘生丁 75 mg 每日 4次; 环磷酰胺 0.2 g 加生理盐水 20 ml 静注, 隔日 1次, 用到总量 6~8 g; 肝素钙 50 mg

皮下注射, 每 12小时 1次; 卡托普利 12.5 mg, 每日 3次。

1.3 疗效评定: ①完全缓解: 多次测定尿蛋白阴性, 尿蛋白定量 < 0.2 g/24 h, 血白蛋白正常或接近正常。②显著缓解: 多次尿蛋白定量 < 1.0 g/24 h, 血白蛋白显著改善。③部分缓解: 蛋白尿减轻, 多次尿蛋白定量 < 3.0 g/24 h。④无效。

2 结果

本组 51例经 1~3个疗程的治疗后, 完全缓解 9例, 其中原发性肾综 6例, 过敏性紫癜肾炎 2例, 狼疮肾炎 1例。显著缓解 7例, 其中原发性肾综 4例, 过敏性紫癜肾炎 3例。部分缓解 27例, 其中原发性肾综 19例, 过敏性紫癜肾炎 7例, 狼疮肾炎 1例。无效 8例, 其中原发性肾综 5例, 狼疮肾炎 3例。总有效率 84.3%。完全缓解者追踪 1~3年未见复发。

3 讨论

黄芪、当归对机体的免疫系统有调节作用, 可增强巨噬细胞的吞噬功能, 促进淋巴细胞的转化, 诱导细胞产生干扰素, 增强自然杀伤细胞(NK)活性^[1], 提高非特异性免疫功能, 从而使血清补体 B因子(BF)和血补体总量 CH₅₀得以回升^[2]。黄芪、当归能使肾综患者在高蛋白饮食基础上降低氮更新率, 加速蛋白质

合成(使肝脏合成白蛋白的能力加强), 从而使白蛋白浓度显著提高, 改善其临床表现^[3,4]。黄芪、当归对肾综高凝状态有改善作用, 其机制为抑制血栓素 A₂合成, 促进前列腺素合成, 抑制血小板内的 5-羟色胺的合成和释放^[2,3]。前列腺素与血栓素之间失衡, 会引起一系列损伤反应。

参考文献:

[1] 苏群, 方强. 黄芪注射液联用西药治疗急性病毒性心肌炎对自然杀伤细胞活性及可溶性白介素-2受体水平的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2000, 7(2): 75-77.

[2] Warrner C, Creiber S, Kramer Guth A, et al. Lipids and progression of renal disease: role of modified low-density lipoprotein and lipoprotein(a). *Kidney Int*, 1997, 52(Suppl 63): S102-S106.

[3] 鲁盈, 李惊子, 郑欣, 等. 黄芪当归合剂对肾病综合征鼠血清脂谱和肾小球硬化的影响. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(8): 478-480.

[4] 李宁军, 李惊子, 郑欣, 等. 黄芪当归合剂对肾病综合征鼠脂蛋白脂酶和卵磷脂胆固醇酰基转移酶的影响. *中国中西医结合杂志*, 1998, 18(8): 484-486.

(收稿日期: 1999-10-26)

修回日期: 2000-06-19)

(本文编辑: 李银平)

基金项目: 山东省菏泽地区科研成果二等奖(20000408)

作者简介: 阎晓勇(1964-), 男(汉族), 山东单县人, 主治医师。