

大鼠, AWR 评分明显降低, 尿 D-木糖排泄率显著增加。焦虑测试结果显示, 大鼠进入开臂次数百分比和开臂滞留时间百分比显著升高 ($P < 0.01$), 血清皮质醇含量显著降低 ($P < 0.01$), 提示康泰胶囊能够明显改善 IBS 内脏高敏感模型大鼠的内脏敏感性和焦虑程度。同时, 与模型组大鼠比较, 康泰胶囊治疗组大鼠 DRG 神经元 Nav1.8 mRNA 表达水平明显降低。从而说明降低 IBS 内脏高敏感模型动物 DRG 神经元 Nav1.8 mRNA 表达水平, 抑制 DRG 神经元兴奋性增加, 从而降低内脏敏感性是康泰胶囊治疗 IBS 内脏高敏感的作用机制之一。

参考文献:

- [1] Clarke G, Quigley EM, Cryan JF, et al. Irritable bowel syndrome: towards biomarker identification [J]. Trends in Molecular Medicine, 2009, 15(10): 478-489.
- [2] Wang W, Gu JG, Li YQ, et al. Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain [J]. Molecular Pain, 2011, 7: 16.
- [3] Qi FH, Zhou YL, Xu GY. Targeting voltage-gated sodium channels for treatment for chronic visceral pain [J]. World Journal of Gastroenterology, 2011, 17(19): 2357-2364.
- [4] 陈冠林, 韩棉梅, 梁嘉恺, 等. 康泰胶囊对肠易激综合征内脏高敏感性大鼠背根神经元兴奋性的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 37-40.
- [5] 张翥, 马继伟, 李寅超. 溢尿停对实验性脾虚 SD 大鼠胃肠功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(8): 703-704.
- [6] Ibeakanma C, Ochoa-Cortes F, Miranda-Morales M, et al. Brain-gut interactions increase peripheral nociceptive signaling in mice with postinfectious irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterology, 2011, 141(6): 2098-2108.
- [7] Ruangsri S. Relationship of axonal voltage-gated sodium channel 1.8 (Nav1.8) mRNA accumulation to sciatic nerve injury-induced painful neuropathy in rats[J]. J Biol Chem, 2011, 286(46): 39836-39847.
- [8] Laird JM, Souslova V, Wood JN, et al. Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8-null mice[J]. J Neurosci, 2002, 22: 8352-8356.
- [9] 王亚雷, 姚玮艳, 章永平, 等. 电压门控钠通道亚单位在大鼠肠易激综合征模型中变化的研究[J]. 胃肠病学, 2006, 11(3): 143-147.
- [10] 王亚雷, 姚玮艳, 章永平, 等. 阻断 Nav1.8 表达对大鼠内脏高敏感性影响的研究[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(2): 83-86.

(编辑: 宋威)

肾康灵对系膜细胞炎症因子的影响

艾斯^{1,2,3}, 郑健^{1,2,3}, 林青^{2,3}, 邱彩霞², 林雄², 宋艳芳^{2,3}(1. 福建中医药大学, 福建福州 350122; 2. 福建中医药大学附属人民医院, 福建福州 350004; 3. 福建省中西医结合肾脏病重点实验室, 福建福州 350004)

摘要: 目的 观察氧化低密度脂蛋白(Oxidized Low-Density Lipoprotein, ox-LDL)对系膜细胞(Mesangial Cells, MCs)分泌炎症介质功能的影响, 并从细胞分子生物学水平阐明肾康灵的作用机理。**方法** 采用肾康灵含药血清干预增殖系膜细胞的方法, 按照随机数字表法分为 7 组, 即正常对照组: DMEM-F12 培养液; ox-LDL 组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); ox-LDL+趋化因子受体(CXCR6)组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+CXCR6; 肾康灵低浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+肾康灵低浓度含药血清; ⑤肾康灵高浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+肾康灵高浓度含药血清; 阿托伐他汀低浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+阿托伐他汀 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 阿托伐他汀高浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+阿托伐他汀 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。以上各组标本培养 24 h 后收集各组细胞及上清液。每组实验细胞重复培养 6 次。分别利用 ELISA 法、RT-PCR 法和 Western blot 法检测趋化因子配体 16 (CXCL16)、清道夫受体-B(CD36)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因水平和蛋白含量。**结果** 利用 ox-LDL ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)诱导大鼠系膜细胞增殖并加入 CXCR6 受体后, CXCL16、

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 艾斯, 女, 博士研究生, 研究方向: 小儿肾病。Email: ella-2002@163.com。通讯作者: 郑健, 主任医师, 教授, 研究方向: 小儿肾病。Email: zhengjian7816@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81202835); 福建省自然科学基金面上项目(2011J01199); 福建省卫生厅青年基金项目(2012-1-30)。

CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 的基因表达均显著升高 ($P < 0.01$), 肾康灵含药血清呈浓度依赖性降低其表达水平, 肾康灵高浓度组降低最显著 ($P < 0.01$)。结论 ox-LDL 诱导系膜细胞增殖时通过 CXCR6 介导, 可促进 CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 等炎症介质的释放, 肾康灵可通过抑制炎症介质的释放, 保护系膜细胞的功能。

关键词: 肾康灵; 系膜细胞; 氧化低密度脂蛋白; CXCL16; CD36

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)04-0431-07

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.011

Effects of *Shenkangling* on Inflammatory Factors Secreted by Mesangial Cells

AI Si^{1,2,3}, ZHENG Jian^{1,2,3}, LIN Qing^{2,3}, QIU Caixia², LIN Xiong², SONG Yanfang^{2,3} (1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122 Fujian, China; 2. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004 Fujian, China; 3. Key Laboratory of Fujian Integrative Chinese and Western for Kidney Disease, Fuzhou 350004 Fujian, China)

Abstract: Objective To observe the effect of oxidized low density lipoprotein(ox-LDL) on the secretion of inflammatory cytokines in mesangial cells (MCs) and to clarify the therapeutic mechanism of *Shenkangling* at the level of cellular molecular biology. **Methods** *Shenkangling*-containing serum (SCS) was obtained from Sprague-Dawley rats which were administered *Shenkangling*. DMEM-F12 culture fluid was used as the basic medium for the culture of MCs (normal control group), and then according to the grouping, 100 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL, 100 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL+CXCR6, 100 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL+low-dose SCS, 100 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL+high-dose SCS, 100 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL+atorvastatin 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL+atorvastatin 100 $\mu\text{mol/L}$ were added separately, namely ox-LDL group, CXCR6 group, low-dose SCS group, high-dose SCS group, low-dose atorvastatin group, and high-dose atorvastatin group. After culturing for 24h, the MCs and MCs supernatant were collected. The cell culture repeated for 6 times. Expression levels of CXCL16, CD36, IFN- γ , IL-6, TNF- α mRNA and protein in MCs were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** CXCL16, CD36, IFN- γ , IL-6 and TNF- α mRNA expression levels were increased obviously in CXCR6 group, and SCS could counteract the expression levels in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** ox-LDL may promote the release of inflammatory mediators of CXCL16, CD36, IFN- γ , IL-6, and TNF- α in mesangial cells mediated by CXCR6, and *Shenkangling* has protective effect for the function of MCs through inhibiting the release of inflammatory cytokines.

Keywords: *Shenkangling*; Mesangial cells; Oxidized low-density lipoprotein; CXCL16; CD36

原发性肾病综合征(Primary Nephrotic Syndrome, PNS)是儿科常见的肾小球疾病^[1], 本病常频繁复发, 严重影响患儿身心健康。以往认为小儿 PNS 病理类型表现多样, 但以微小病变型最为多见。现代研究表明, 反复迁延不愈的 PNS 患儿往往可表现为系膜增生性肾小球肾炎、局灶节段硬化性肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎或硬化性肾炎。而小儿 PNS 在各种病理类型表现中常伴有不同程度的系膜细胞(Mesangial Cells, MCs)增生和系膜基质增多。氧化低密度脂蛋白(Oxidized Low-Density Lipoprotein, ox-LDL)可与细胞膜上的受体结合, 沉积于肾脏固有细胞内, 促使其释放各种因子, 最终引起 MCs 增生和细胞外基质沉积, 从而导致肾小球纤维化, 甚至引起终末期肾损伤^[2], 因此, ox-LDL 被认为是肾脏损

伤中的关键性介质^[3]。肾小球硬化是判断小儿 PNS 预后的重要因素之一, 故抑制 MCs 增殖从而延缓 PNS 患儿肾小球硬化的慢性进展是当前临床急需解决的关键问题。

本研究通过观察 ox-LDL 对 MCs 分泌炎症介质如趋化因子配体 16(CXCL16)、清道夫受体-B(CD36)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响, 并应用益肾活血中药肾康灵进行干预, 从细胞分子生物学角度阐明肾康灵干预 PNS 的作用机制, 为提高小儿 PNS 的临床疗效和肾康灵治疗小儿 PNS 的临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物 大鼠肾小球系膜细胞(CRL-2573),

购于美国模式培养物集存库(ATCC)。健康 SD 大鼠 50 只, 2~3 月龄, 体质量 200~300 g, 雄性, 由上海斯莱克动物实验有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药品、试剂及仪器 肾康灵制备: 黄芪 30 g, 生地 15 g, 山茱萸 9 g, 山药 12 g, 茯苓 9 g, 牡丹皮 15 g, 三七 9 g 等, 煎煮、过滤、离心、浓缩至生药浓度分别为低浓度 $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 高浓度 $3.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 由福建中医药大学附属人民医院制剂室提供。阿托伐他汀, 美国辉瑞公司, 批号: J201100610。DMEM-F12 培养基、胎牛血清、0.25 %胰酶, 美国 GIBCO 公司; 人氧化低密度脂蛋白, 英国 AbD Serotec 公司; ELISA 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; CXCL16, 批号: EK0165, CD36, 批号: EK0284, IFN- γ , 批号: EK0375, IL-6, 批号: EK0412, TNF- α , 批号: EK0527, TRIZOL, 美国 Invitrogen 公司; CXCL16 antibody (FG12)、CD36 antibody (H-300), 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; PCR 所用引物由美国 Invitrogen 公司合成。DENLEY DRAGON Wellscan MK 3 型酶标仪、Wellwash 4 MK2 型洗板机, 芬兰 Thermo 公司; PTC-225 Peltier Thermal cycler 型 PCR 仪, MJ Research Inc., Waltham, Massachusetts; CFX-96 荧光定量 PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; Waters 2695 高效液相色谱仪, 美国沃特斯公司。

1.3 肾康灵含药血清的制备 取 SD 大鼠 50 只, 按照体质量分层随机化原则分为空白组 10 只, 肾康灵低浓度组 ($15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和高浓度组 ($30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 各 20 只, 灌胃给药, 空白组给予等量生理盐水灌胃, 每天 2 次, 连续 7 d。7 d 后, 给药随机组各取 2 只大鼠测含药血清浓度。根据含药血清浓度的情况, 延长给药时间至 14 d 和 21 d。在末次给药 2 h 后乙醚麻醉, 腹主动脉采血, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h, $3500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 灭活、过滤、分装, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 含药血清高效液相色谱的测定 取上述收集的血清样品 3 mL, 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中快速冻融, 加 5 % 的高氯酸沉淀蛋白, $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 血清样品分为上清液和下层蛋白, 取上清液 700 μL 进行固相萃取(SPE), 经活化、蒸馏水洗柱、加样、淋洗和洗脱后, 采用电喷雾离子化(ESI)方式进行 HPLC 检测。色谱条件如下: 质核比范围: 100~1500 m/z。正离子模式: 毛细管电压 2.97 kV, 锥孔电压 70.00 V; 负离子模式: 毛细管电压 2.50 kV, 锥孔电压

50.00 V。采用 Masslynx 4.00 软件(Waters 公司提供) 处理和分析数据: 记录色谱峰的峰面积, 并分析峰面积的变化情况。

1.5 系膜细胞的培养 MCs 常规培养于含 10 % 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 DMEM-F12(dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12 ham's)培养液中, 置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 孵箱中孵育, 2~4 d 换液传代 1 次, 取 4~6 代细胞用于正式实验。

1.6 MTT 法检测 MCs 的增殖率 用移液枪将混匀的 MCs 接种于 96 孔板中, 每孔体积 150 μL 。分别加入 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同浓度的 ox-LDL 刺激, 培养 24, 48, 72 h。每个浓度组 3 个复孔, 重复实验 3 次。培养 24 h 后, 轻轻吸净培养板上的培养液, 用无血清培养液清洗 1 次, 每孔加入 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 200 μL , 继续孵育 30 min 后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 200 μL 的 DMEM-F12 的振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 OD 值。

1.7 实验分组 取处于对数生长期的 MCs 接种于 6 孔板, 培养 24 h 待细胞达到亚融合状态, 换用含 10 % FBS 的 DMEM-F12 培养液继续孵育 24 h, 使所有 MCs 生长同步化, 按照随机数字表法分为 7 组观察: 正常对照组: DMEM-F12 培养液; ox-LDL 组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ox-LDL+趋化因子受体 (CXCR6) 组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +CXCR6; 肾康灵低浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +肾康灵低浓度含药血清; 肾康灵高浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +肾康灵高浓度含药血清; 阿托伐他汀低浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +阿托伐他汀 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 阿托伐他汀高浓度组: DMEM-F12 培养液+ox-LDL 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +阿托伐他汀 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以上各组标本培养 24 h 后收集各组细胞及上清液。每组实验细胞重复培养 6 次。

1.8 ELISA 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 含量 每孔各加入标准品或待测样品 100 μL , 将反应板充分混匀后置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 min。用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次, 滤纸吸干。每孔中加入第一抗体工作液 100 μL 。将反应板充分混匀后置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min。再次洗板(同前)。每孔加酶标抗体工作液 100 μL 。将反应板置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min。再洗板(同前)。每孔加入底物工作液 100 μL , 置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗处反应 15 min。每孔加入 100 μL 终止液

混匀。30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测定吸光值。

1.9 RT-PCR 法检测 MCs 的 CXCL16 和 CD36 的 mRNA

(1) TRIZOL 法提取 MCs 的 RNA;(2) RT(逆转录)反应;(3)RT-PCR 反应:以 cDNA 为模板,SYBR Green I 为荧光标记物,以 ABI PRISM 7500 RT-PCR System 进行实时荧光定量 PCR 测定。反应条件为 95 ℃, 30 s, 95 ℃, 5 s 循环 40 次, 60 ℃, 34 s, 循环 40 次, 95 ℃, 15 s, 60 ℃, 1 min, 95 ℃, 15 s。以 GAPDH 为内参照,检测 CXCL16、CD36 的表达。扩增后目的基因相对表达量 = 2^{- (Cytokine Ct-GAPDH Ct)}。公式中 Cytokine 指目的基因, Ct(cycle threshold)指循环阈值:目的基因 cDNA 达到指数扩增时的循环数。引物序列见表 1。

1.10 Western blot 法检测 MCs 的 CXCL16 和 CD36

表 1 PCR 引物序列、长度和循环温度 Table 1 PCR primers sequence, product length and cycling temperature

Table with 4 columns: 扩增基因 (Amplified Gene), 引物序列 (5'-3') (Primer Sequence), 产物长度 (Product Length), 循环温度 (Cycling Temperature). Rows include CXCL16, CD36, and GAPDH.

蛋白含量 提取 MCs 总蛋白; SDS-PAGE 电泳; 转膜; 封闭; 一抗; 二抗; 化学发光, 显影, 定影: 将洗好的膜取出, 放在 X-光片夹中, 用滤纸小心吸干表面水分。然后, 将显影液 A 和 B 等体积混合, 并滴向目的条带, 盖上塑料膜。在暗室中把 X 光片

放在膜上, 曝光 1 min(暗室操作, 避光)。冲洗曝光后的胶片, 将胶片扫描。

1.11 统计学处理方法 数据以均数 ± 标准差(x ± s)表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 肾康灵含药血清的测定 采用 HPLC 法检测大鼠灌胃 7, 14, 21 d 后收集血清目标化合物色谱峰的峰面积。结果表明, 7 d 和 14 d 时肾康灵低、高浓度组的大鼠含药血清峰面积增加, 而第 14 天增加最显著, 第 21 天峰面积出现下降, 见图 1。将肾康灵低、高浓度组与空白组的色谱图相比较发现 3 个差异峰, 与药材色谱图比对发现: 保留时间为 25.5 min 的色谱峰可能是药材所含的原型成分, 通过液相制备该样品, 并进行质谱分析, 判断此成分为马钱子苷, 并将此成分作为本研究控制的目标成分, 见图 2。

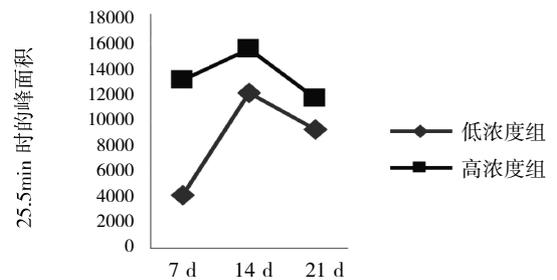


图 1 25.5 min 的色谱峰峰面积

Figure 1 T 25.5 min Peak area of chromatograms at 25.5 min

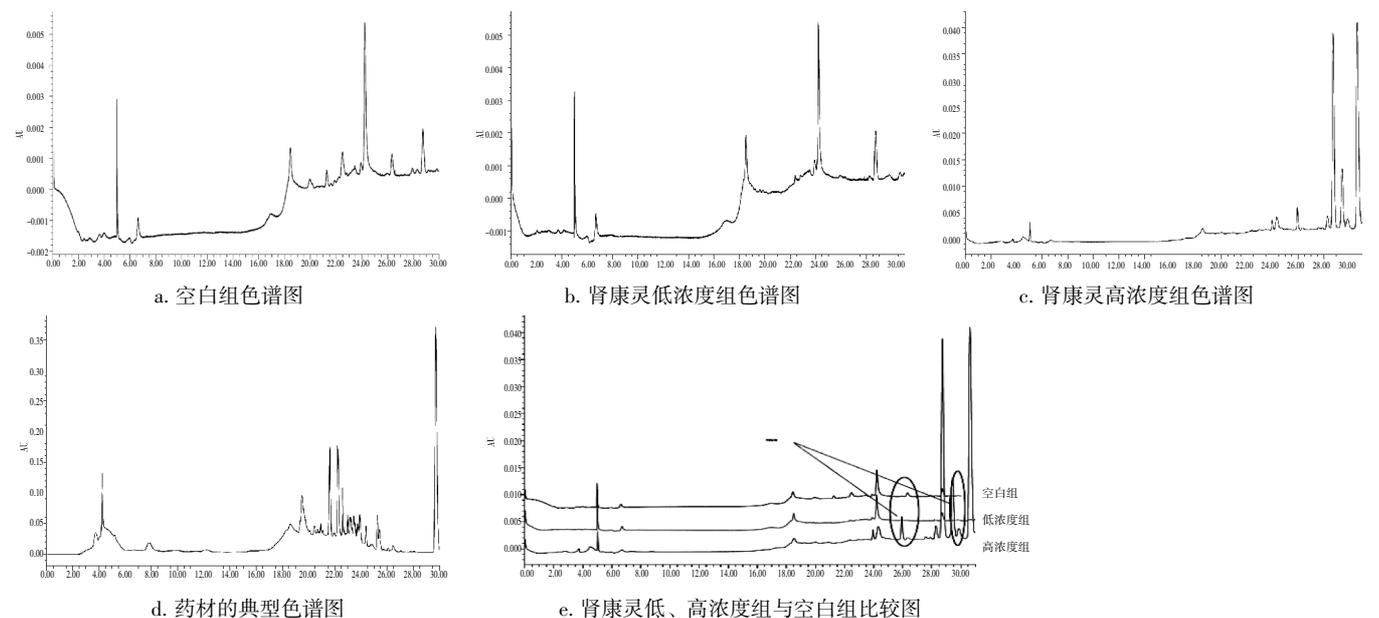


图 2 各组色谱比较图

Figure 2 Comparison of chromatograms in different groups

2.2 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞的增殖曲线 采用 ox-LDL (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别作用于大鼠肾小球系膜细胞 24, 48, 72 h 后, 用 MTT 法检测, 测定 OD 值。结果显示 ox-LDL 对系膜细胞的增殖作用具有浓度依赖性, 干预浓度为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 系膜细胞的吸光度值开始增加, 浓度达 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时增加最明显 ($P < 0.01$), 见图 3。因 ox-LDL 对系膜细胞的增殖作用不具有时间依赖性, 无论是 24, 48, 72 h 增殖率未发生显著改变, 故实验采用 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ox-LDL 干预系膜细胞 24 h。ox-LDL+CXCR6 干预 MCs 后增殖水平进一步得到提高。

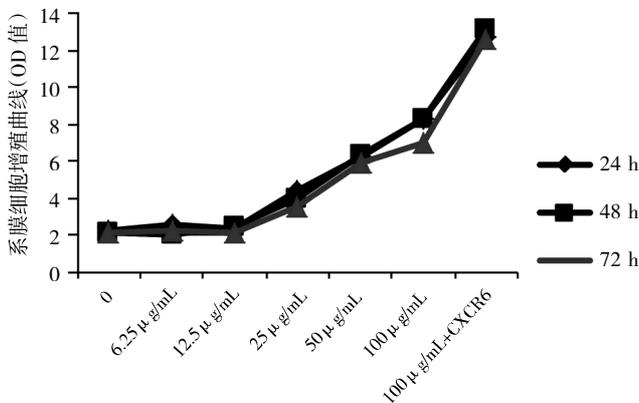


图 3 不同浓度的 ox-LDL 诱导系膜细胞的增殖情况

Figure 3 MCs proliferation induced by different concentrations of ox-LDL

2.3 ELISA 法检测 MCs 表面 CXCL16 和 CD36 的含量 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, CXCL16、CD36 表达水平显著升高, 与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 用 ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, CXCL16、CD36 表达水平进一步升高, 与 ox-LDL 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 使用肾康灵低、高浓度的含药血清及阿托伐他汀治疗后, 各治疗组均能显著降低 CXCL16、CD36 的水平, 与 ox-LDL 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而肾康灵高浓度组 CXCL16、CD36 含量下降明显优于肾康灵低浓度组 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀高浓度组 CXCL16 含量优于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.4 ELISA 法检测 MCs 表面 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 的含量 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, IFN- γ 、IL6、TNF- α 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$), ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, IFN- γ 、IL6、TNF- α 的表达水平进一步升高 ($P < 0.01$), 使用不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预治疗后, 各治疗组均

能显著降低 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 水平 ($P < 0.01$), 其中, 肾康灵高浓度组降低 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量水平更为显著 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀高浓度组降低 TNF- α 的作用明显优于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 2 ELISA 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36 含量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 CXCL16 and CD36 production in MCs detected by ELISA

组别	剂量	CXCL16/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	CD36/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
正常对照组	-	2.82 \pm 0.57	1.93 \pm 0.45
ox-LDL 组	-	12.19 \pm 1.64 [#]	8.19 \pm 1.43 [#]
ox-LDL+CXCR6 组	-	15.69 \pm 0.63 ^{△△}	13.14 \pm 0.90 ^{△△}
肾康灵低浓度组	15 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	7.67 \pm 0.71 ^{△△}	5.91 \pm 1.02 ^{△△}
肾康灵高浓度组	30 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5.35 \pm 0.79 ^{△△**}	3.52 \pm 0.57 ^{△△**}
阿托伐他汀低浓度组	50 $\mu\text{mol/L}$	7.93 \pm 0.73 ^{△△}	5.77 \pm 1.08 ^{△△}
阿托伐他汀高浓度组	100 $\mu\text{mol/L}$	6.10 \pm 0.71 ^{△△**}	5.21 \pm 0.58 ^{△△}

注: 与正常对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与阿托伐他汀低浓度组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

表 3 ELISA 法检测 MCs 的 IFN、IL6、TNF- α 的含量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 IFN, IL6, TNF- α production in MCs detected by ELISA

组别	剂量	IFN- γ / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
正常对照组	-	156.84 \pm 14.60 [#]	151.61 \pm 21.62 [#]	157.05 \pm 18.09 [#]
ox-LDL 组	-	516.27 \pm 52.80	462.54 \pm 36.48	461.30 \pm 23.2
ox-LDL+CXCR6 组	-	599.10 \pm 17.80 ^{△△}	531.23 \pm 27.62 ^{△△}	529.19 \pm 12.80 ^{△△}
肾康灵低浓度组	15 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	360.73 \pm 62.84 ^{△△}	351.84 \pm 25.94 ^{△△}	342.89 \pm 27.85 ^{△△}
肾康灵高浓度组	30 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	263.38 \pm 47.46 ^{△△**}	237.72 \pm 28.10 ^{△△**}	226.66 \pm 21.33 ^{△△**}
阿托伐他汀低浓度组	50 $\mu\text{mol/L}$	373.55 \pm 60.26 ^{△△}	344.95 \pm 30.11 ^{△△}	340.56 \pm 24.94 ^{△△}
阿托伐他汀高浓度组	100 $\mu\text{mol/L}$	343.46 \pm 40.32 ^{△△}	311.86 \pm 46.22 ^{△△}	263.38 \pm 28.50 ^{△△**}

注: 与正常对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与阿托伐他汀低浓度组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与阿托伐他汀高浓度组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.5 RT-PCR 检测 MCS 表面 CXCL16、CD36 的 mRNA 水平

ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, CXCL16、CD36 的基因水平显著升高 ($P < 0.01$), 用 ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, CXCL16、CD36 的基因水平进一步升高 ($P < 0.01$); 使用不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀治疗后, 各治疗组均能显著降低 CXCL16、CD36 的基因水平 ($P < 0.01$), 其中, 肾康灵高浓度组降低 CXCL16、CD36 的基因水平最为显著, 阿托伐他汀高浓度组降低 CD36 水平明显优于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.6 Western Blot 法检测 MCs 表面 CXCL16、CD36 蛋白含量

ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, CXCL16、

表 4 RT-PCR 法检测系膜细胞 CXCL16、CD36 基因水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 CXCL16 and CD36 mRNA expression in MCs detected by real-time PCR

组别	剂量	CXCL16	CD36
正常对照组	-	22.48 ± 0.90 [#]	18.50 ± 3.65 [#]
ox-LDL 组	-	49.93 ± 6.99	53.8 ± 5.08
ox-LDL+CXCR6 组	-	63.00 ± 2.99 ^{△△}	68.62 ± 0.88 ^{△△}
肾康灵低浓度组	15 g·kg ⁻¹	36.78 ± 4.77 ^{△△*}	39.67 ± 3.08 ^{△△}
肾康灵高浓度组	30 g·kg ⁻¹	28.25 ± 3.95 ^{△△*}	26.37 ± 6.08 ^{△△*}
阿托伐他汀低浓度组	50 μmol/L	37.82 ± 8.22 ^{△△}	36.09 ± 10.85 ^{△△}
阿托伐他汀高浓度组	100 μmol/L	37.78 ± 6.25 ^{△△}	31.55 ± 3.72 ^{△△*}

注:与正常对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与阿托伐他汀低浓度组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

CD36 的蛋白含量显著升高 ($P < 0.01$); ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, CXCL16、CD36 的蛋白含量进一步升高 ($P < 0.01$); 使用不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预治疗后, 各治疗组均能显著降低 CXCL16、CD36 的蛋白含量 ($P < 0.01$), 肾康灵高浓度组 CXCL16 的蛋白含量明显低于阿托伐他汀浓度组 ($P < 0.05$), 肾康灵高浓度组 CD36 的蛋白含量明显低于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 Western Blot 法检测系膜细胞 CXCL16、CD36 蛋白含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 CXCL16 and CD36 protein levels in MCs detected by Western Blot

组别	剂量	CXCL16/%	CD36/%
正常对照组	-	122.05 ± 1.17	118.50 ± 3.66
ox-LDL 组	-	174.37 ± 6.11 [#]	162.13 ± 15.0 [#]
ox-LDL+CXCR6 组	-	187.20 ± 2.74 ^{△△}	176.57 ± 2.19 ^{△△}
肾康灵低浓度组	15 g·kg ⁻¹	136.78 ± 4.77 ^{△△}	139.67 ± 3.08 ^{△△}
肾康灵高浓度组	30 g·kg ⁻¹	128.25 ± 3.95 ^{△△*}	126.37 ± 6.08 ^{△△*}
阿托伐他汀低浓度组	50 μmol/L	140.37 ± 16.31 ^{△△}	136.50 ± 3.69 ^{△△}
阿托伐他汀高浓度组	100 μmol/L	137.78 ± 6.25 ^{△△}	131.55 ± 3.72 ^{△△}

注:与正常对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与阿托伐他汀低浓度组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨论

PNS 是儿科常见的肾小球疾病。CXCL16 是 21 世纪初新发现的 ox-LDL 细胞表面受体, 参与相关的生物学效应, 被命名为结合磷脂酰丝氨酸和氧化脂蛋白的清道夫受体(scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein, SR-PSOX)^[4]。CXCL16 既具有清道夫受体功能, 又具有趋化因子的

功能, 成为疾病治疗中具有十分重要意义的靶分子, 在免疫调节中可能具有双重作用^[5]。血浆 CXCL16 的水平随着慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD) 早期到终末期的进展而逐渐升高, 并且与肾功能的变化具有相关性, 由此证明 CXCL16 可能是 CKD 进展的生物标志物^[6]。CD36 是一种 B 型清道夫受体, 位于多种细胞表面。CD36 作为一种表面受体, 能与潜在的转化生长因子 β (Transforming Growth Factor beta, TGF-β) 相互作用, 并将其致纤维化作用的生物活性激活^[7]。研究^[8]表明, CD36 在血小板、单核巨噬细胞、微血管内皮细胞、脂肪组织、骨骼肌和心脏中表达, 对 CD36 缺陷患者进行研究并确定了几种 CD36 基因突变类型, 指出 CD36 的表达缺陷型巨噬细胞与 ox-LDL 的结合减少 50%, 从而证明 CD36 是 ox-LDL 的主要受体之一。CD36 在慢性移植抗宿主病(chronic graft-versus-host disease, cGVHD) 免疫球蛋白 Fc 段受体 γ 链基因敲除大鼠的脂蛋白肾小球病(lipoprotein glomerulopathy, LPG) 的进展中扮演了重要角色^[9]。

本研究表明, ox-LDL 对系膜细胞的增殖作用不具有时间依赖性, 但具有浓度依赖性, 当 ox-LDL 的浓度为 100 μg·mL⁻¹ 时诱导系膜细胞的增殖率达到最高峰, 使 CXCL16、CD36、IFN-γ、IL6、TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.01$), 因此, 认为 ox-LDL 可诱导 MCs 的增生, 促进 IFN-γ、IL6、TNF-α、CXCL16、CD36 等炎症因子的释放, 而 CXCR6 受体介导这一过程。从而加重肾小球损伤, 因此, ox-LDL 被认为是肾脏损伤中的关键性介质。采用中药肾康灵干预治疗后发现, 可明显降低 CXCL16、CD36、IFN-γ、IL6、TNF-α 的含量或基因水平, 并呈浓度依赖性降低, 抑制系膜细胞的增殖, 并且比阿托伐他汀治疗组降低更显著, 故可认为肾康灵通过抑制炎症介质的释放, 从而保护系膜细胞的功能。

肾康灵是由黄芪、生地、山茱萸、山药、茯苓、牡丹皮、三七等中药组成。方中黄芪补气升阳、利水消肿、益气行血, 生地清热凉血、益肾活血, 二药共为君药, 主益肾活血; 山茱萸补益肝肾、收敛固涩, 山药益气养阴、补脾肾、固肾精, 牡丹皮活血凉血, 三七活血化瘀止血。全方共奏益肾气、行气血、化瘀血之功效, 应用于临床治疗 PNS 已有 20 余年, 取得了显著的疗效, 而且益肾活血法疗效明显优于单纯益肾法和单纯活血法。本研究通过结合现代分子生物学技术, 证实益肾活血肾康灵可抑制

CXCL16、CD36 的释放，进而减少 IFN- γ 、IL6、TNF- α 等炎症介质的分泌，有效地抑制系膜细胞的增殖而发挥其保护作用。

参考文献：

- [1] 杨霖云, 白克敏. 小儿肾脏病基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 10: 1.
- [2] Andrea CS, Bruce MH. The regulation of mesangial cell proliferation[J]. Nephron Exp Nephrol, 2008, 108: 74-79.
- [3] Lee HS, Song CY. Oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis[J]. Am J Nephrol, 2009, 29: 62-70.
- [4] Mitsuoaka H, Toyohara M, Kume N, et al. Circulating soluble SR-PSO X/CXCL16 as a biomarker for acute coronary syndrome-comparison with high-sensitivity C-reactive protein[J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16 (5): 586-593.
- [5] McKimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 1006-1011.
- [6] Lin Z, Gong Q, Zhou Z, et al. Increased plasma CXCL16 levels in patients with chronic kidney diseases[J]. Eur J Clin Invest, 2011, 41 (8): 836-845.
- [7] Yang YL, Lin SH, Chuang LY, et al. CD36 is a novel and potential anti-fibrogenic target in albumin-induced renal proximal tubule fibrosis [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 735-744.
- [8] Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 299(1-2): 19-22.
- [9] Miyahara Y, Nishimura S, Watanabe M, et al. Scavenger receptor expressions in the kidneys of mice with lipoprotein glomerulopathy[J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16(1): 115-121.

(编辑: 宋威)

健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠肝功能及水通道蛋白 9 的影响

李 嘉^{1,2}, 刘友章³, 陈美仁¹, 吴海滨¹(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 湖南中医药高等专科学校, 湖南 株洲 412012; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 观察健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠肝功能及肝组织水通道蛋白 9 (AQP 9) 表达的影响。方法 将 Wistar 大鼠, 随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 健脾活血祛湿方高、中、低剂量组(52, 26, 16.25 g·kg⁻¹), 秋水仙碱组 (100 μ g·kg⁻¹), 观察大鼠的一般情况, 测定腹水量、检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB) 的含量及 AQP 9 mRNA 转录与蛋白翻译水平。结果 健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠症状有明显的改善作用, 能促进模型大鼠腹水消退、改善相应肝功能指标, 具有良好的保肝作用; 与模型组比较, 健脾活血祛湿方组 AQP 9 mRNA 转录与蛋白翻译水平均有不同程度的升高, 作用强度与用药剂量呈正相关。结论 健脾活血祛湿方良好的保肝作用及对 AQP 9 的升高作用是其治疗肝硬化腹水的靶点之一。

关键词: 健脾活血祛湿方; 肝硬化腹水; 水通道蛋白 9

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)04-0437-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.012

Effect of Jianpi Huoxie Qushi Prescription on Hepatic Function and Aquaporin 9 Expression in Cirrhotic Rats with Ascites

LI Jia^{1,2}, LIU Youzhang³, CHEN Meiren¹, WU Haibin¹(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012 Hunan, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 李嘉, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治消化系统疾病。Email: lijiaacy1314@sina.com。

基金项目: 湖南省中医药管理局中医药科学研究项目(2013116)。