

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00633

## 川芎嗪对转化生长因子 $\beta_1$ 诱导的人肾小球系膜细胞增殖及Ⅳ型胶原分泌的影响

薛潇春<sup>1\*</sup>, 刘芳<sup>2</sup>

1. 解放军 101 医院药剂科, 无锡 214044
2. 解放军 455 医院药剂科, 上海 200052

**[摘要]** **目的** 观察川芎嗪对转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 诱导的人肾小球系膜细胞增殖及Ⅳ型胶原分泌的影响。**方法** 采用 TGF- $\beta_1$  诱导肾小球系膜细胞增殖和Ⅳ型胶原表达以模拟肾脏疾病中的细胞纤维化, 实验分为 5 组: 空白组, 对照组, 川芎嗪高、中、低剂量(终浓度分别为 100、30、10  $\mu\text{g/ml}$ )组。MTT 法检测肾小球系膜细胞的增殖抑制率, ELISA 法检测肾小球系膜细胞Ⅳ型胶原的表达。**结果** 川芎嗪高剂量(100  $\mu\text{g/ml}$ )能够抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的肾小球系膜细胞增殖( $P < 0.01$ ); 川芎嗪可抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的肾小球系膜细胞中Ⅳ型胶原的表达, 以高剂量组(100  $\mu\text{g/ml}$ )效果最为显著( $P < 0.01$ )。**结论** 川芎嗪可抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的肾小球系膜细胞增殖及Ⅳ型胶原分泌。

**[关键词]** 川芎嗪; 肾小球系膜细胞; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 胶原Ⅳ型

**[中图分类号]** R 692.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0633-03

### Effect of ligustrazine hydrochloride injection on TGF- $\beta_1$ -induced proliferation and type Ⅳ collagen secretion in human mesangial cells

XUE Xiao-chun<sup>1\*</sup>, LIU Fang<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, No. 101 Hospital of PLA, Wuxi 214044, Jiangsu, China
2. Department of Pharmacy, No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of ligustrazine hydrochloride(LHC) injection on TGF- $\beta_1$ -induced proliferation and type Ⅳ collagen secretion in the human mesangial cells(HMCs). **Methods** The interstitial fibrosis in kidney disease was mimicked by inducing proliferation and type Ⅳ collagen secretion in HMCs with TGF- $\beta_1$ . The experiment was divided into 5 groups: blank, control, low, medium, and high(10, 30, and 100  $\mu\text{g/ml}$ )ligustrazine hydrochloride groups. MTT method was adopted to examine the proliferation and inhibition rate of HMCs. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the production of type Ⅳ collagen in cultured HMCs. **Results** LHC at high concentration (100  $\mu\text{g/ml}$ ) significantly inhibited the proliferation of HMCs ( $P < 0.01$ ). LHC also inhibited the production of type Ⅳ collagen, with the significant inhibition found when at the concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** LHC can greatly inhibit TGF- $\beta_1$ -induced proliferation and expression of type Ⅳ collagen in human mesangial cells.

**[Key words]** ligustrazine hydrochloride; mesangial cells; transforming growth factor- $\beta_1$ ; collagen type Ⅳ

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6): 633-635]

慢性肾功能衰竭是由多种慢性疾病引起肾脏损害和进行性恶化的结果, 使机体在排泄代谢废物和调节水、电解质、酸碱平衡等方面出现紊乱的临床综合征候群, 是威胁生命的重要病症之一, 肾小球硬化和肾间质纤维化是其主要病理改变。有研究显示转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 可以促进肾小管上皮损伤, 并通过多种途径促进肾小球硬化和肾间质纤维化<sup>[1]</sup>。TGF- $\beta_1$  还可通过促

进巨噬细胞浸润并使之激活, 分泌细胞因子和化学因子, 包括 MCP-1、IL-1、TNF 和Ⅳ型胶原等, 而且 TGF- $\beta_1$  能够促进人肾小球系膜细胞 (human mesangial cells, HMCs) 的增殖和细胞外基质 (ECM) 相关蛋白表达, 从而放大病肾的炎症反应和引起肾间质纤维化<sup>[2]</sup>。可以说, 在肾病发生和发展的整个过程中, TGF- $\beta_1$  的过量表达起着推动作用。川芎嗪 (ligustrazine hydrochloride, LHC) 在临床上配合其他

**[收稿日期]** 2011-03-01 **[接受日期]** 2011-05-05

**[作者简介]** 薛潇春, 主管药师。

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0510-85142245, E-mail: zhangwenjun198383@yahoo.com.cn

药物治疗肾脏疾病已取得一定的疗效,但其作用机制尚不明确<sup>[3-4]</sup>。本研究通过体外实验观察川芎嗪对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 增殖的抑制作用以及对 HMCs 中Ⅳ型胶原表达的影响,探讨川芎嗪治疗肾脏疾病的可能机制。

### 1 材料和方法

1.1 细胞株、药物及试剂 HMCs 由南京军区总院肾病研究所提供。盐酸川芎嗪注射液由哈尔滨三联药业有限公司生产,0.12 g/支。四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma 公司;胰蛋白酶(1:250)购自 Gibco 公司;人Ⅳ型胶原 ELISA 试剂盒购自 Uscnlife 公司;TGF-β<sub>1</sub> 购自 Peprotech 公司。

1.2 细胞培养 采用 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,细胞 80%融合时用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3 川芎嗪对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 增殖的影响 将处于对数生长期的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液,细胞密度为 2×10<sup>4</sup>/孔。取 96 孔细胞培养板并于每孔中加入 100 μl 细胞悬液培养 4 h,细胞基本贴壁后吸去培养液上清,加入 200 μl 无血清培养液培养 24 h 使细胞同步,之后吸去培养液。分组:空白组中加入 200 μl 的 RPMI 1640 培养液;对照组中加入 TGF-β<sub>1</sub> (终浓度为 5 ng/ml);高、中、低剂量组中分别加入终浓度为 100、30、10 μg/ml 的 LHC 和终浓度为 5 ng/ml 的 TGF-β<sub>1</sub>,药物均用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液溶解稀释,每个剂量设 6 孔。培养 48 h,培养结束前 4 h 各孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl,再继续孵育 4 h 后去上清,每孔加入二甲基亚砷 200 μl,振荡混匀 10 min 后于 Tecan Infinite 200 多功能酶标仪测 570 nm 波长处光密度(D)值,并计算细胞抑制率。抑制率(%)=(对照组 D 值-加药组 D 值)/(对照组 D 值-空白组 D 值)×100%。

1.4 川芎嗪对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 中Ⅳ型胶原表达的影响 将处于对数生长期的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液,细胞密度为 2×10<sup>5</sup>/孔。取 24 孔细胞培养板并于每孔中加入 1 ml 混悬液,培养 24 h,待细胞融合至 70%~80%时吸去上清,加入无血清培养液 1 ml 培养 24 h 使细胞同步。分组:(1)空白组中加入 1 ml 含 10%FCS 的 DMEM 培养液;(2)对照组中加入 TGF-β<sub>1</sub> (终浓度为 5 ng/ml);(3)高、中、低剂

量组中分别加入终浓度为 100、30、10 μg/ml 的 LHC 和终浓度为 5 ng/ml 的 TGF-β<sub>1</sub>,药物均用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液溶解稀释。培养 48 h 后取出吸去上清, PBS 冲洗 3 遍。吸净 PBS 后将 24 孔板置于冰盒上,加入含 10% PMSF 的裂解液裂解 30 min。用移液枪将细胞碎片和裂解液混合物移至离心管,于 4℃ 条件下 500×g 离心 5 min,分装上清,-20℃ 保存。用 ELISA 试剂盒检测上清中Ⅳ型胶原含量。

1.5 统计学处理 数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,组间差异性比较采用方差分析,检验水平(α)为 0.05。

### 2 结果

2.1 川芎嗪对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 增殖的影响 结果如表 1 所示,川芎嗪高、中、低剂量组对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 增殖均有抑制作用,抑制率分别为 72%、55%、35%,高于对照组(0, P<0.01),抑制效应呈剂量依赖关系。

表 1 川芎嗪对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 增殖的影响

Tab 1 Effect of ligustrazine hydrochloride on proliferation in HMCs induced by TGF-β<sub>1</sub>

(n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	D value	Inhibition rate (%)
Blank	0.81±0.14	
Control	2.09±0.21**	0
LHC ρ <sub>B</sub> /(μg·ml <sup>-1</sup> )		
10	1.64±0.20	35△△
30	1.38±0.22△△	55△△
100	1.16±0.08△△	72△△

LHC: Ligustrazine hydrochloride; HMCs: Human mesangial cells.  
\*\* P<0.01 vs blank group; △△ P<0.01 vs control group

2.2 川芎嗪对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 中Ⅳ型胶原表达的影响 结果如图 1 所示,川芎嗪各剂量组对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HMCs 中Ⅳ型胶原表达有不同程度的抑制作用,其中高、中剂量组和对照组比较差异有统计学意义(P<0.01),并呈一定的剂量依赖关系。

### 3 讨论

HMCs 属于肾脏血管周围固有细胞,是肾小球中功能最活跃的细胞,具有多种功能。正常情况下体内 HMCs 不增殖,但在多种因素作用下, HMCs 可发生异常增殖,同时伴有系膜基质增多,最终导致

肾小球硬化<sup>[5]</sup>。HMCs是肾小球硬化发生过程中ECM的主要产生细胞或称效应细胞<sup>[6]</sup>。多种致病因素引起炎症及细胞因子的产生导致HMCs增殖及ECM分泌是肾小球硬化形成的关键步骤。寻找防止系膜细胞增殖并阻断其分泌ECM的因素无疑对防治肾脏疾病的发生和发展并延缓肾功能恶化具有重要的临床意义<sup>[7-8]</sup>。在对肾小球肾炎、糖尿病肾病等多种肾脏疾病的研究中均发现,体内TGF- $\beta_1$ 表达较正常情况下有明显的增加,而TGF- $\beta_1$ 能够促进HMCs的增殖和ECM相关蛋白表达,这被认为是临床上慢性肾功能衰竭发生发展的原因之一<sup>[9-10]</sup>。

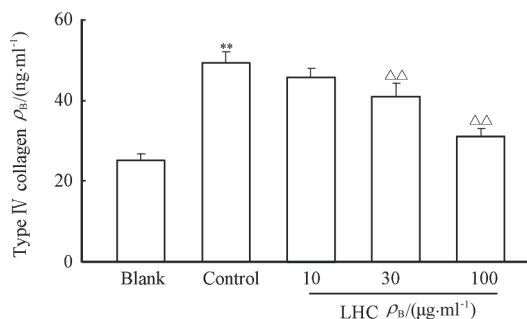


图1 川芎嗪对TGF- $\beta_1$ 诱导的HMCs中IV型胶原表达的影响

Fig 1 Effect of ligustrazine hydrochloride on production of type IV collagen in human mesangial cells induced by TGF- $\beta_1$

\*\*  $P < 0.01$  vs blank group,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs control group;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

本研究利用TGF- $\beta_1$ 诱导在体外培养的HMCs,从而形成一系列的应激反应,其中包括IV型胶原表达量的增加。IV型胶原是肾小球系膜基质和肾小球基底膜的重要成分,它反映了肾脏ECM胶原蛋白的代谢状态,其合成或降解的异常与肾病的发展有关<sup>[11]</sup>。通过考察IV型胶原表达的情况,观察川芎嗪对于TGF- $\beta_1$ 活性的抑制作用,可以说明川芎嗪在治疗肾脏疾病中的作用方式。

本研究结果显示,TGF- $\beta_1$ 能诱导HMCs细胞增殖,并且细胞内ECM物质IV型胶原含量也显著提高,这可能是造成ECM过多积聚和肾小球硬化的原因之一。临床上有许多关于对川芎嗪治疗肾脏疾病的报道,但是并没有通过分子机制来探讨川芎嗪对肾脏的保护作用<sup>[12-15]</sup>。本研究结果证实:川芎嗪各剂量组对TGF- $\beta_1$ 诱导的HMCs中IV型胶原表达有

不同程度的抑制作用,其中高、中剂量组和对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明川芎嗪能够抑制病变状态下TGF- $\beta_1$ 的活性,从而抑制HMCs增殖和ECM物质积聚,这也可能是其临床上用于保护肾脏治疗肾脏疾病的分子机制,值得进一步深入研究。

## [参考文献]

- [1] Gilbert R E, Cox A, Wu L L, Allen T J, Hulthen U L, Jerums G, et al. Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition[J]. Diabetes, 1998, 47: 414-422.
- [2] 陈丽, 何泽云, 周志忠. 肾脏纤维化的发生机制与高血压相互关系[J]. 中华中西医杂志, 2007, 8: 1360-1362.
- [3] 刘加和, 林甲宜. 川芎嗪、开搏通联用治疗早期糖尿病肾病[J]. 实用糖尿病杂志, 2005, 1: 33-34.
- [4] 刘键. 川芎嗪注射液治疗IgA肾病40例疗效观察[J]. 中国中医急症, 2010, 19: 752-753.
- [5] 叶太生, 周必发, 张莹雯. 百令胶囊对大鼠肾小球系膜细胞增殖、IV型胶原及TGF- $\beta_1$  mRNA表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 11: 41-43.
- [6] 王泰华. 系膜细胞激活与肾小球损害[J]. 国外医学: 泌尿系统分册, 1996, 16: 125-128.
- [7] 王景明, 孙奕, 叶传惠. 肾衰宁灌肠液对体外培养的人肾小球系膜细胞增殖及产生纤维连接蛋白的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7: 353-355.
- [8] Ghosh Choudhury G, Abboud H E. Tyrosine phosphorylation-dependent PI3 kinase/Akt signal transduction regulates TGF-beta-induced fibronectin expression in mesangial cells[J]. Cell Signal, 2004, 16: 31-41.
- [9] Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Suzuki T, Yatsu T, Shibasaki M. Effect of vasopressin on type IV collagen production in human mesangial cells[J]. Regul Pept, 2008, 147(1-3): 60-66.
- [10] Russo L M, Brown D, Lin H Y. The soluble transforming growth factor-beta receptor: advantages and applications[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41: 472-476.
- [11] Ban C R, Twigg S M. Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers[J]. Vasc Health Risk Manag, 2008, 4: 575-596.
- [12] 薛海蓉, 牛文忠, 张义堂. 川芎嗪注射液佐治小儿肾病综合征52例临床疗效分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2010, 13: 1616-1618.
- [13] 徐红. 川芎嗪在治疗慢性肾功能衰竭中的作用[J]. 中医杂志, 2010, 51(S1): 165-166.
- [14] 李晓贤. 卡托普利联合丹参川芎嗪注射液治疗糖尿病肾病22例疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17: 962-963.
- [15] 郭巍, 刘凤荣. 川芎嗪注射液治疗轻中度慢性肾衰竭的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3: 142-143.

[本文编辑] 商素芳