

防己黄芪汤对于足细胞功能蛋白基因表达的影响^{*}

叶宜静¹, 鲁 盈², 杨汝春^{3△}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江杭州 310000; 2. 浙江省立同德医院, 浙江杭州 310000;

3. 杭州市中医院, 浙江杭州 310007)

摘要: **目的** 观察防己黄芪汤及加减防己黄芪汤对于 TGF- β 1 诱导的足细胞中 P-cadherin、FSP-1 基因表达的影响。**方法** 培养足细胞,待其分化成熟后将其分成对应 4 组,模型组和正常组足细胞用含 10% 正常大鼠血清的培养液孵育,模型组及干预组用 TGF- β 1 刺激,干预组在此基础上分别用含 10% 防己黄芪汤、10% 加减防己黄芪汤大鼠含药血清的培养液孵育。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 P-cadherin、FSP-1 的基因表达。**结果** 与正常组相比,模型组 P-cadherin 的基因表达显著降低,FSP-1 无显著差异;与模型组相比,干预组 P-cadherin 的基因表达则显著增高,正常组、模型组、及干预组 FSP-1 表达无显著差异。**结论** 防己黄芪汤和加减防己黄芪汤具有维持肾小球足细胞的表型分子表达的作用。

关键词: 防己黄芪汤; 足细胞; P-cadherin; FSP-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)02-0020-04

防己黄芪汤出自汉代张仲景的《金匱要略》,是一张益气祛风除湿的名方,一直以来广泛应用于肾病水肿病人的临床治疗上。《金匱要略·痉湿喝病脉证第二》即有云:“风湿,脉浮、身重、汗出恶风者,防己黄芪汤主之”。而近几年的研究发现,足细胞作为一种高度分化的终末细胞,在防止中、大分子量的蛋白漏出的分子屏障中起着重要的作用。其典型病变表现为蛋白尿。本实验旨在探讨防己黄芪汤及加减防己黄芪汤对于足细胞的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

8 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,清洁级,体重 200 ± 20 g,由浙江中医药大学动物实验中心 [SYXK (浙) 2008-0115] 提供。

1.2 试剂及药物

RPMI1640(Gibco),胎牛血清(Gibco),重组鼠干扰素 γ (Recombinant Murine interferon- γ , γ -IFN, 美国 PeproTech Inc, Cat. No. 315-05),重组人 TGF- β 1 (美国 PeproTech Inc, Cat.No. 100-21),大鼠 I 型胶原

原(R&D Systems, Inc, Cat. No. 3440-100-01),胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶 (英国 Gibco 生物公司),RNAiso Plus (TakaRa, D9108B),Reverse transcriptase(上海生工,00093109),Ribonuclease inhibitor(上海生工, RB0478),Taq DNA polymerase (上海生工, SC0010),P-cadherin 引物、FSP 引物、内参 β -actin (上海生物工程有限公司合成)。中药材:黄芪、汉防己、白术、甘草、苍术、仙灵脾、茯苓、薏苡仁、生姜、大枣,以上药材均为浙江中医药大学统一采购的道地药材。

1.3 主要仪器

低温低速离心机 (Heraeus, LEGENT RT, 德国),二氧化碳(CO₂)恒温培养箱(Heraeus Cell 150, 德国),倒置显微镜(Olympus, IX70, 日本),微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific, NADODROP 1000),凝胶成像分析系统(Bio-Rad, UVP 1000, 美国),制冰机(SCOTSMAN, AF100, 意大利),低温高速离心机(Heraeus, Biofuge Stratos, 德国),水平电泳仪(Bio-Rad, 美国)。

^{*} 基金项目: 浙江省中医药优秀青年人才基金(NO:2011ZQ017)

收稿日期: 2013-04-03 修回日期: 2013-04-12

作者简介: 叶宜静 (1987~), 女, 浙江景宁人, 硕士研究生在读, 从事中医药防治肾脏病方向研究。

Δ 通信作者: 杨汝春, E-mail: yangruchunhz@163.com

2. 方法与步骤

2.1 中药汤剂的制备

中药处方分别为:防己黄芪汤:黄芪 15g, 汉防己 12g, 白术 9g, 甘草 6g, 生姜 4 片, 大枣 1 枚; 加减防己黄芪汤: 黄芪 30g, 汉防己 15g, 苍术 10g, 白术 10g, 仙灵脾 15g, 茯苓 30g, 薏苡仁 30g。成人按 60kg 每日 1 剂。大鼠灌胃药量则根据成人每日药量计算, 除以 60kg 体重成人的体表面积 (1.6m^2), 再乘以大鼠体表面积 (200g 大鼠 0.0308m^2) 和血清稀释倍数 10 (细胞培养液血清含量为 10%) 得出每只大鼠每日灌胃生药量, 用水煎至 6mL, 每日分两次灌胃。

2.2 含药血清的制备^[1-2]

动物顺应性饲养 1 周后, 干预组分别以防己黄芪汤、加减防己黄芪汤温服灌胃, 剂量为 3mL/次/只, 每天灌胃 2 次, 连续灌胃 3d。正常组及模型组大鼠予以等量蒸馏水灌胃。灌胃第 3d, 末次给药后 1 小时股动脉取血, 37°C 温浴 30min 后, 3 000rpm 离心, 取上层血清, 56°C 水浴灭活 40min, 于细胞室超净台抽滤除菌并分装, 置于 -80°C 冰箱备用。

2.3 足细胞培养

小鼠肾足细胞由美国 Mendel Peter 教授惠赠。将从液氮中复苏的足细胞用含有 γ -干扰素 (γ -IFN) 10U/mL 和 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 置于 33°C , 5% CO_2 培养箱中孵育, 让细胞增殖传代; 然后, 换成不含 γ -IFN 的 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 将其转移至 37°C , 5% CO_2 培养箱培养分化 2 周。

2.4 细胞分组及处理方法

将足细胞分成正常组、模型组、防己黄芪汤干预组、加减防己黄芪汤干预组, 模型组及干预组分别采用 TGF- β 1 (终浓度 5ng/mL) 刺激, 模型组和正常组足细胞用含 10% 正常大鼠血清的培养液孵育, 干预组在 TGF- β 1 刺激之前 30min 加入防己黄芪汤及加减防己黄芪汤含药血清预孵育, 加入 TGF- β 1 后 37°C 继续培养 24h。

2.5 RT-PCR 检测 P-cadherin, FSP-1 基因表达

用 Trizol 提取足细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定样品的总 RNA 含量。用 M-MLCV 逆转录为 cDNA, 在 PCR 仪上扩增。引物由上海生工公司合成, 其上下游引物序列、长度及退火温度如表 1。PCR 反应条件: 95°C 5min, 95°C 变性 20s, $50\sim 60^\circ\text{C}$ 退火 30s, 72°C 延伸 20s, 为 35 个周期。PCR 产物经过

1.7% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 BIO-RAD 凝胶成像系统及配套软件 Quantity-one 软件包进行分析结果, 结果以目的条带和内参 β -actin 条带的光密度之比来表示。

表 1 引物序列

引物名称 (长度, 退火温度)	上下游引物序列
β -actin (211bp, 59.5°C)	正链 5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3' 负链 5'-TTCCTGCTTGCTGATCCACTG-3'
P-cadherin (150bp, 58.4°C)	正链 5,-TGAAGATCTCCACAGCTGCAT-3, 负链 5,-ACTTCGAGTGACAAAGACGAC-3,
FSP-1 (307bp, 53.9°C)	正链 5,-GAGTGACAAAGACGACCCCTTC-3, 负链 5,-ATCTCCACAGCTGCATTGAAG-3

2.6 统计学方法

计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 使用统计软件 SPSS17.0 进行统计分析, 资料符合正态分布、方差齐的前提下进行单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较使用 LSD 法分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 多组间比较采用单因素方差分析, 计数资料采用卡方检验。

3 结果

3.1 防己黄芪汤和加减防己黄芪汤对足细胞上 P-cadherin、FSP-1 基因表达的影响

正常组小鼠足细胞表达一定量的 P-cadherin mRNA 和 FSP mRNA。与正常组相比, 模型组 P-cadherin 的基因表达明显下降 ($P<0.05$)。与模型组相比, 干预组 P-cadherin 的则显著增加 ($P<0.01$)。各组间 FSP-1 的基因表达无显著性差异。见图 1, 表 2。

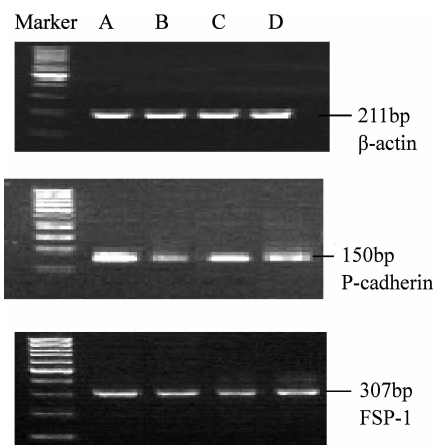


图 1 β -actin、P-cadherin、FSP-1 的 PCR 扩增结果

注: A: 正常组 B: 模型组 C: 防己黄芪汤组 D: 加减防己黄芪汤组

表 2 防己黄芪汤和加减防己黄芪汤对足细胞表型的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	实验重复次数	P-cadherin/ β -actin 光密度比值	FSP-1/ β -actin 光密度比值
正常组	3	1.273 $\pm$ 0.1361	0.892 $\pm$ 0.1281
模型组	3	0.513 $\pm$ 0.0862 $^{\Delta}$	0.996 $\pm$ 0.0648
防己黄芪汤组	3	0.937 $\pm$ 0.0763 $^{**\Delta}$	0.803 $\pm$ 0.0746
加减防己黄芪汤组	3	0.803 $\pm$ 0.0286 $^{**\Delta}$	1.075 $\pm$ 0.0945 $^{\Delta}$

注:与模型组对照, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与正常组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

4 讨论

防己黄芪汤出自仲景的经典名方,加减防己黄芪汤则是在仲景原方的基础上,加强了利水渗湿、扶正健脾的功效,近年来被广泛使用在慢性肾炎、慢性肾衰、类风关、心衰、浮肿、高血压肾损害等多种疾病的临床治疗上,在肾病治疗中发现可改善慢性肾衰竭患者肾功能水平^[3]以及改善高血压肾损害导致的浮肿症状^[4],具有较好疗效。当代中医认为,“风邪”在肾小球疾病的发生发展中也起到重要作用。任继学教授主张将现代医学肾小球炎一类的疾病,中医定名为“肾风”^[5],王永钧教授则进一步提出风湿是慢性肾脏病最常见、最重要的病因,亦是疾病在慢性进展过程中的独立危险因素^[6]。蛋白尿是肾脏的主要临床表现,也是王永钧教授提出的“风湿扰肾”证的主要依据之一^[7]。蛋白尿排泄量的多少一方面反映了“风邪扰肾”在肾脏病形成中的作用,另一方面也反映了肾小球毛细血管壁的滤过屏障(包括机械屏障和电荷屏障)的受损程度,临床研究和实验模型均证实足细胞上许多大分子及细胞因子等均参与了蛋白尿的形成,在许多疾病中,足细胞的损伤和结构异常是蛋白尿产生的关键^[8]。

最近的研究显示,足细胞在 TGF- β 刺激下可发生上皮细胞向间充质细胞的逆转,导致细胞发生去分化,从而失去复杂的足细胞形态学结构和高度特异性功能^[9]。足细胞向间充质细胞的逆向分化可表现为其上皮标志 P-钙粘蛋白(P-cadherin)、标志蛋白、裂孔隔膜蛋白 Podocin 等表达下降,而获得间充质细胞标志物的表达,如 Strutz^[10-11]等研究发现在肾间质纤维化病变过程中,损伤的上皮细胞中成纤维细胞特异型蛋白-1(FSP-1)表达增加。有研究认为,肾组织内 p-cadherin 表达下调可能使足细胞骨架蛋白的信号传递发生障碍,足细胞结构进一步

破坏,并使其与 GBM 间相互作用减弱,导致铆钉于 GBM 的足细胞松动,甚至从 GBM 剥离、脱落,滤过膜的完整性遭到破坏导致蛋白尿产生^[12]。本项研究旨在将“风湿扰肾”理论、防己黄芪汤及加减防己黄芪汤的临床疗效与足细胞结构的内在改变有机联系起来。研究表明体外观察药物对足细胞损伤的保护和修复作用是一种实之有效的试验方法^[13],前期实验提示防己黄芪汤可降低单侧输尿管结扎模型大鼠血尿素氮,使血白蛋白升高;减轻肾小管间质纤维化程度;同时,显著降低肾小管和肾间质 α -SMA、FN 的蛋白和基因表达^[14-15],以及明显改善阿霉素肾痛大鼠蛋白尿,调节足细胞 nephrin、podocin 的表达^[16]。

本研究提示:防己黄芪汤及加减防己黄芪汤的“祛风行水利湿作用”可抑制 TGF- β 对足细胞 P-cadherin 表达的下调作用,具有维持足细胞表型分子及足细胞结构的作用,从而延缓足细胞向间充质细胞逆向分化的过程,提示这可能是其通过保护足细胞来降低蛋白尿的分子机制之一;防己黄芪汤与加减防己黄芪汤对 P-cadherin 的基因表达无显著差异,可能与含药血清的制备有关。但是这两者对于 FSP-1 的基因表达的影响均不具有统计学差异($P>0.05$)。说明在本实验观察周期内,对防己黄芪汤进行加减对于改善足细胞表型及结构损伤无显著影响。

参考文献

- [1] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95-98.
- [2] 詹红生. 含药血清实验方法及其在中药新药研制中的应用展望[J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(2): 79-82.
- [3] 杨利. 任继学教授对肾小球肾炎的中医理论见解[J]. 广州中医药大学学报, 2003, 20(1): 79-81.
- [4] 韩洪. 防己黄芪汤加减治疗慢性尿酸性肾病 32 例观察[J]. 北京中医, 2004, 23(3): 155-157.
- [5] 马界, 陈学忠, 王毅, 等. 防己黄芪汤加减结合西药治疗高血压肾损害水肿的临床观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(8): 879-880.
- [6] 王永钧. 慢性原发性肾小球疾病的风湿证候[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(12): 683-685.
- [7] 裴怡. 王永钧从风湿论治慢性肾病的经验[J]. 浙江中医杂志, 2009, 7(44): 472-474.
- [8] 李世军. 蛋白尿形成的分子基础[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2001, 10(6): 560-563.

- [9] Yingjian L, Young Sun K, Chunsun D, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is a Potential Pathway Leading to Podocyte Dysfunction and Proteinuria[J]. American Journal of Pathology, 2008, 172: 299-308.
- [10] Strutz F, Okada H, Lo CW, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP-1 [J]. J Cell Biol, 1995, 130: 393-405.
- [11] 楚非, 邹万忠, 孙锁柱, 等. 大鼠肾小管间质纤维化中肾小管上皮细胞表型转化的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2003, 19: 13-14.
- [12] 刘声茂, 许钟镐, 徐锋, 等. 全反式维甲酸对糖尿病肾病肾小球 p-cadherin 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(22): 2195-2198.
- [13] 陈朝红, 刘志红, 孙骅, 等. 雷公藤甲素干预足细胞病变的体外观察[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2007, 16(2): 119-200.
- [14] 陈洪宇, 揭乐琴, 王永钧, 等. 防己黄芪汤加减干预对阿霉素肾病大鼠肾组织 MCP-1 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(11): 958-962.
- [15] 俞东容, 杨汝春, 王军, 等. 防己黄芪汤防治肾间质纤维化的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 1000-1002.
- [16] 俞东容, 杨汝春, 林宜, 等. 防己黄芪汤对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及足细胞病的变影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(4): 295.

(编辑:迟越)

Impact of Fangji Huangqi Decoction for the Podocyte Function of Protein Gene Expression

YE Yi-jing¹, LU Ying², YANG Ru-chun³

(1. The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang 310000;

2. Tongde Hospital of Zhejiang province, Hangzhou Zhejiang 310000;

3. Hangzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Hangzhou Zhejiang 310007)

ABSTRACT: Objective In order to observe the Fangji Huangqi Decoction and modified Fangji Huangqi Decoction on expression of P-cadherin and FSP-1 gene in TGF- β 1-induced podocytes. **Methods** Unified cultured podocytes, then divided into 4 groups after the differentiation and maturation. Podocyte of model group and normal group were incubated in culture medium containing 10% normal rat serum, the model group and intervention group with TGF- β 1 stimulates, intervention group were respectively based on the medium containing 10% Fangji Huangqi decoction, 10% modified Fangji Huangqi Decoction drug-containing serum of rats with. Using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for the detection of P-cadherin, FSP-1 gene expression. **Results** Compared with normal group, model group, P-cadherin gene expression was significantly reduced, while FSP-1 was no significant difference; Compared with the model group, the intervention group the expression of P-cadherin is significantly increased, the normal group, model group, and intervention group had no significant difference in FSP-1 expression. **Conclusion** Fangji Huangqi Decoction and modified Fangji Huangqi decoction can maintain podocyte phenotype molecule expression.

KEY WORDS: Fangji Huangqi; Decoction Podocyte; P-cadherin; FSP-1