

# 黄芪、水蛭及其配方含药血清对脂多糖诱导增生的大鼠 GMCs 中 NF- $\kappa$ B p65、MMP-2 mRNA 表达的影响

顾叶云<sup>1,2</sup> 赵宝玲<sup>1,2</sup> 徐 蕾<sup>1,2</sup> 任现志<sup>1,2</sup>

(1.江苏省中医院, 江苏南京 210029; 2.南京中医药大学中医儿科学研究所, 江苏南京 210023)

**摘要** 目的:观察黄芪、水蛭及其配方含药血清对脂多糖(LPS)诱导增生大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)表达核转录因子 p65 (NF- $\kappa$ B p65)、金属蛋白酶组织抑制剂-2 (MMP-2)的影响,探索益气化瘀药物及其配方含药血清治疗系膜增生性肾小球肾炎的可能机制。方法:LPS诱导大鼠GMCs (HBEH)增殖,分别采用黄芪高剂量血清、水蛭高剂量血清、黄芪高剂量水蛭高剂量血清、黄芪低剂量水蛭高剂量血清进行干预,24h后收集细胞,用CCK-8法观察含药血清对GMCs增殖的影响,Real time PCR法测定 NF- $\kappa$ B p65、MMP-2 因子的表达变化。结果:LPS诱导系膜细胞增殖后,NF- $\kappa$ B p65mRNA表达较正常组明显升高( $P<0.01$ ),表达量达到正常细胞的2.07倍,各含药血清组NF- $\kappa$ B p65mRNA表达量与LPS组比较均显著下降( $P<0.01$ )。LPS诱导GMCs增殖后,MMP-2 mRNA表达较正常组明显升高( $P<0.01$ ),表达量达到正常细胞的2.0倍,而各含药血清组MMP-2 mRNA表达量与LPS组比较均显著下降( $P<0.01$ )。上述指标各含药血清组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:黄芪、水蛭及其配方含药血清能够通过影响NF- $\kappa$ B p65、MMP-2的表达减少GMCs的增殖及细胞外基质的沉积,益气化瘀含药血清的应用有利于缓解系膜增生性肾小球肾炎的进展。

**关键词** 黄芪;水蛭;肾小球系膜细胞;NF- $\kappa$ B p65;MMP-2;含药血清;大鼠;实验研究

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2019)05-0078-04

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81173298)

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是我国小儿慢性肾炎中常见的病理类型。现代医学大多从减少细胞外基质环境中的促细胞生长因子刺激,抑制细胞周期性进展和阻遏从胞膜到胞核的促使生长信号传导途径三个主要环节入手治疗。核转录因子(NF- $\kappa$ B)是应激与炎性反应的中枢调节物。有研究发现,肝细胞生长因子通过阻断NF- $\kappa$ B信号通路途径而发挥抗肾脏炎症的作用,提示NF- $\kappa$ B活性可能与肾炎的发生发展相关<sup>[1]</sup>。而从不同环节寻找药物用于治疗 and 预防与NF- $\kappa$ B有关的疾病,已成为时下热点研究方向。金属蛋白酶组织抑制剂(MMPs)是肾脏内主要的基质降解酶体系,其活性高低直接影响肾小球内细胞外基质(ECM)的表达量与局部沉积,对ECM有广泛的降解作用。其中MMP-2可通过降解IV型胶原等基膜样基质而抑制肾小球内ECM的局部沉积。中医治疗MsPGN以“益气化瘀”为治疗原则,疗效显著。黄芪、水蛭分别为益气、化瘀代表药物。黄芪参与肾脏机体的多种代谢,具有免疫增强和免疫抑制双向调节作用,能抑制系膜细胞增殖。大量药物成分提

取分析研究证实,黄芪富含的微量元素硒能加强某些自由基清除剂的抗氧化作用,进而推断黄芪能抑制肾性蛋白尿<sup>[2-3]</sup>。也有研究表明,水蛭素可以缓解与凝血功能障碍相关的肾脏局部炎症反应导致的肾组织损伤<sup>[4]</sup>,达到抑制肾病进展的目的。本实验通过检测黄芪、水蛭及其配方含药血清对脂多糖诱导增生的大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)中NF- $\kappa$ B、MMP-2 mRNA表达的影响,探索益气、化瘀中药延缓肾小球纤维化进程的可能作用机制。

## 1 实验材料

1.1 实验动物及细胞 正常雄性SD大鼠,清洁级,2~3月龄,体重180~200g,由浙江省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(浙)20080033,在南京中医药大学动物饲养室完成动物饲养。大鼠GMCs(HBEH):由徐州医学院实验室馈赠,保存于武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。

1.2 药物与试剂 黄芪、炙水蛭(滑石粉炒制),南京海昌药业提供。黄芪加10倍水浸泡1h,煮沸30min后再煎1h,纱布过滤,二煎加水8倍,煮沸后再煎1h,纱布过滤,两煎相合,水浴浓缩煎成

浓度为1.5g/mL药液。水蛭高速粉碎机研粉,乙醇回流提取,配成0.3g/mL混悬液。脂多糖(LPS):10mg/支,美国Sigma公司,批号:111M4035V;胎牛血清,美国gibco公司;二甲基亚砷(DMSO),美国AMRESCO公司;DAPI、RIPA裂解液、PMSF、SDS-PAGE上样缓冲液(5×)、30% Acr-Bis、Tris、HCL、Glycine、SDS、RNase free水,碧云天生物科技研究所;Cell Counting Kit-8(CCK-8),日本同仁公司;逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒,大连宝生物公司;NF-κB p65(D14E12)、XP<sup>®</sup>Rabbit mAb抗体,美国CST公司;MMP-2兔抗大鼠荧光一抗,美国SANTA CRUZ公司;0.25%胰蛋白酶,美国hyclone公司;引物由上海生工合成,驴抗兔二抗(美国Invitrogen公司),双抗(碧云天生物科技研究所);DMEM低糖培养基,美国hyclone公司。

1.3 主要仪器 一次性塑料培养板(美国Costar公司),倒置显微镜(德国leica公司),大容量高速低温离心机(德国Eppendorf公司),一次性滤器(0.22μm,美国Millipore公司),CO<sub>2</sub>培养箱(日本SANYO公司),封口膜(美国PARAFILM公司),电子天平(上海天平仪器厂),Olympus BX51光学显微镜(日本Olympus公司),实时荧光定量PCR仪(德国Roche公司),液氮生物容器(四川亚西橡塑机器有限公司),数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),酶标仪(美国Biotech公司),PCR自动系列化分析仪(Master cycler gradient)。

## 2 实验方法

2.1 含药血清的制备 健康SD大鼠30只,随机分为黄芪高剂量组、水蛭高剂量组、黄芪高剂量水蛭高剂量组、黄芪低剂量水蛭高剂量组、正常对照组,每组5只。大鼠给药剂量参照文献[5]提供的实验动物与人临床用药剂量换算公式。黄芪高剂量组每日予黄芪水煎浓缩液4mL/200g体重灌胃,水蛭高剂量组每日予水蛭混悬液4mL/200g体重灌胃,黄芪高剂量水蛭高剂量组每日分别予黄芪水煎浓缩液灌胃、水蛭混悬液各4mL/200g体重(浓缩,共用4mL)灌胃,黄芪低剂量水蛭高剂量组每日分别予黄芪水煎浓缩液2mL/200g体重和水蛭混悬液4mL/200g体重(浓缩,共用4mL)灌胃,空白对照组予等剂量生理盐水灌胃。各组大鼠每日灌胃2次,连续5d。于末次给药后2h,取10%水合氯醛腹腔麻醉,无菌条件下,颈动脉取血,分装于10mL干净离心管中,置4℃冰箱中静置约1h后,4℃离心机,离心半径12cm,2000r/min离心10min。用一次性无菌吸管吸取上层血清,置于新的

离心管,56℃水浴锅内30min灭菌处理,-70℃低温冷冻保存备用。

2.2 含药血清最大无毒浓度及LPS最佳药用浓度的筛选 细胞在96孔板种板,于培养箱中培养24h后,用CCK-8试剂盒进行实验。在96孔板除去四周加PBS孔,剩余10列,其中一块从左到右依次加入浓度为90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%的含药血清,余下1列加入等量的单培,每孔100μL。使用酶标仪在450nm波长处测定OD值,细胞存活率=加药组OD值/正常对照组OD值,按细胞存活率90%以上作为细胞的最大无毒浓度,结果见表1。同法运用CCK-8试剂盒,在96孔板除去四周加PBS孔,前4列每列分别加入浓度为10、5、2.5、1.25μg/mL的LPS,第5、6列加入单培,每列设6个复孔。按细胞存活率150%,计算出脂多糖的最佳造模浓度为10μg/mL。

表1 各组含药血清最大无毒浓度

组别	样本数	浓度
黄芪高剂量组	6	20%
水蛭高剂量组	6	30%
黄芪高剂量水蛭高剂量组	6	30%
黄芪低剂量水蛭高剂量组	6	30%

2.3 含药血清干预LPS诱导后的GMCs 细胞以 $1 \times 10^5$ 个/L铺于6孔细胞培养板,每孔2.0mL,分为正常组、LPS组、黄芪高剂量血清组、水蛭高剂量血清组、黄芪低剂量水蛭高剂量血清组、黄芪高剂量水蛭高剂量血清组,待细胞长至60%左右时,除正常组外,其余各组吸弃细胞培养液,每孔加2.0mL 10μg/mL脂多糖,37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温孵育24h,吸弃细胞培养液,黄芪高剂量血清组加20%黄芪高剂量含药血清,水蛭高剂量血清组、黄芪低剂量水蛭高剂量血清组、黄芪高剂量水蛭高剂量血清组分别加30%的含药血清,正常组、LPS组加维持液。37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱继续培养24h,6孔板收集细胞做PCR实验。实验重复5次,观察趋向性,以趋向性一致次数多的实验结果作为参考数据。

2.4 RT-PCR法检测各组GMCs中NF-κB p65、MMP-2 mRNA表达水平 按照Trizol试剂说明书提取各组细胞总RNA,260nm的吸光度测定OD值和RNA浓度,按照RT-PCR试剂盒说明书进行逆转录合成cDNA。逆转录条件:37℃,15min;85℃,5s。按照试剂盒步骤进行实时荧光定量PCR,反应条件:第一阶段,95℃预变性30s;第二阶段,95℃变性5s,55℃退火10s,72℃延伸5s。共40个循环。引物序列见表2。

表2 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	Forward GCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	Reverse TTGGTGGTGCAGGATGCATT
MMP-2	Forward AGGGCACCTCTTACAACAGC
	Reverse CCCGGTCATAATCCTCGGTG
NF-κB p65	Forward AGTGGGGACCCATCAGGCA
	Reverse GCAGTGTGGGGGCACGGTT

2.5 统计学方法 RT-PCR以GAPDH为管家基因,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量,计算公式: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ 。其他实验数据采用SPSS 17.0软件进行分析处理,结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间两两比较采用单因素方差分析,方差不齐采用Kruskal-wallis Test检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 实验结果

黄芪、水蛭及其复方含药血清对LPS诱导增殖的GMCs中NF-κB p65、MMP-2 mRNA表达的影响见表3。LPS诱导细胞增殖后,LPS组细胞NF-κB p65、MMP-2 mRNA表达量明显升高,分别是正常组的2.07、2.00倍,组间比较有统计学差异( $P < 0.01$ );而各药物血清组细胞NF-κB p65、MMP-2 mRNA表达量与LPS组比较明显降低( $P < 0.01$ ),但各药物血清组之间比较差异无统计学意义。

表3 各组细胞NF-κB p65、MMP-2 mRNA表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	NF-κB p65 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	MMP-2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
正常组	5	1.0±0.00	1.0±0.00
LPS组	5	2.07±0.30 <sup>*</sup>	2.00±0.13 <sup>*</sup>
黄芪高剂量血清组	5	0.52±0.10 <sup>▲</sup>	0.55±0.06 <sup>▲</sup>
水蛭高剂量血清组	5	0.52±0.04 <sup>▲</sup>	0.52±0.09 <sup>▲</sup>
黄芪高剂量水蛭高剂量血清组	5	0.57±0.43 <sup>▲</sup>	0.50±0.21 <sup>▲</sup>
黄芪低剂量水蛭高剂量血清组	5	0.59±0.07 <sup>▲</sup>	0.58±0.16 <sup>▲</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与LPS组比较,▲ $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

MsPGN是我国慢性肾炎中常见的病理类型,可归属于中医学“水肿”“虚劳”“尿血”“癃闭”范畴。益气、化瘀法是治疗本病的主要疗法,本研究观察了益气、化瘀法代表中药及其复方的含药血清对系膜细胞的增殖和纤维化细胞因子表达的抑制作用。结果表明,脂多糖能够诱导肾系膜细胞因子NF-κB p56、MMP-2的表达上调,而黄芪、水蛭及其复方的含药血清则能够不同程度地下调NF-κB p56、MMP-2的表达。

研究显示,MMP-2 mRNA在肾组织中阳性染色

主要表达在肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞胞质内,参与肾小球损伤的后期阶段,认为它通过调节ECM在正常肾脏中的转归,进而维持肾小球结构和功能的正常<sup>[6-7]</sup>。现代医学认为MsPGN的主要病理改变是由于活化的NF-κB诱导多种炎症介质,这些炎症介质又进一步激化NF-κB,诱导炎症反应,最终致使肾脏损害及肾纤维化<sup>[8-10]</sup>。本实验结果表明,各组含药血清均能够抑制LPS诱导系膜细胞增殖后NF-κB p65的表达,减少与NF-κB介导或启动的炎症介质及细胞因子的释放,从而减少由炎症诱导的细胞增殖、肾纤维化及肾小球硬化等肾脏疾病的发生发展。各组含药血清也均能显著降低LPS诱导系膜细胞增殖后MMP-2的表达,调节ECM的合成和代谢平衡,调节系膜细胞的增殖与分化,从而减少系膜细胞的增殖及细胞外基质的沉积,缓解系膜增生性肾小球肾炎的进展。

课题组前期研究发现,益气化瘀法可以通过降低血清TGF-β1、IV型胶原的表达,从而抑制细胞增殖和细胞外基质的分泌,达到治疗肾炎的目的<sup>[11]</sup>;黄芪、水蛭含药血清可以提高系膜细胞的凋亡率,抑制增生,且能够减少细胞外基质的沉积,说明中药益气化瘀法治疗肾小球疾病具有优势<sup>[12-13]</sup>。而本实验表明,黄芪、水蛭有效成分可通过影响NF-κB p56、MMP-2的表达,以减少细胞增殖、细胞外基质沉积及炎症反应,进而延缓疾病向肾小球硬化进展。但各血清组之间的作用效果无明显差异,益气代表中药黄芪和化瘀代表中药水蛭的单独血清组与配伍血清组的治疗效果一致,说明“益气”“化瘀”治法的主次关系需进一步明确。在未来的研究中应进一步进行药物有效成分和成分配伍研究,明确药物作用于疾病的物质基础、最佳作用浓度和作用靶点,进一步辨析“益气”治法与“化瘀”治法在疾病进程中的地位,从而阐明中药通过抑制相关因子的表达抑制系膜细胞增殖及ECM沉积的可能机制,探讨益气化瘀中药保护肾脏的可能机制,为现代中医药治疗小儿MsPGN提供药理学依据。

### 参考文献

- [1] SETHI S, FERVENZA F C. Membranoproliferative glomerulonephritis: pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification[J]. Semin Nephrol, 2011, 31 (4): 341.
- [2] 严彬, 牛茜, 南晓东, 等. 黄芪注射液对大鼠肾缺血-再灌注损伤的影响[J]. 医药导报, 2006, 25 (1): 10.
- [3] 是俊凤, 朱汉威, 张翀, 等. 黄芪注射液治疗慢性肾小球肾炎的观察[J]. 上海第二医科大学学报, 2002, 22 (3): 245.

# 甘草提取物活性成分药理作用研究进展

李 想 李 冀

(黑龙江中医药大学,黑龙江哈尔滨 150040)

**摘 要** 甘草性平味甘,归脾、胃、心、肺经,为临床常用药,具有补中益气、润肺止咳、清热解毒、缓急止痛、调和诸药之功。甘草提取物主要活性成分包括甘草皂苷类的甘草皂苷、甘草酸、甘草次酸,甘草黄酮类的甘草总黄酮、甘草苷、异甘草素、光甘草定,以及甘草多糖。近期的研究集中在甘草活性成分的抗肿瘤、抗炎杀菌、抗病毒、保肝、抗心肌缺血、抗纤维化等药理作用方面,而对于抗氧化、抗动脉粥样硬化和神经保护作用等的药效物质基础及作用机制还有待进一步研究,甘草其他有效成分及其综合作用的研究也还需要加强。

**关键词** 甘草;甘草提取物;活性成分;药理学;综述

**中图分类号** R282.710.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2019)05-0081-06

**基金项目** 国家中医药管理局名老中医工作室项目

甘草为豆科多年生草本植物,是临床常用、不可或缺的中药材。因其能调和百药、解百毒,故有“国老”之称。甘草初载于《神农本草经》,被称为美草、密甘,列为上品,认为其主五脏六腑寒热邪气、坚筋骨、长肌肉、倍力、金疮肿、解毒<sup>[1]</sup>。甘草主要用于治疗炎症、心脑血管疾病、氧化衰老、肿瘤等,这些与甘草提取物活性成分的药理作用密不可分。甘草提取物主要活性成分包括甘草皂苷类的

甘草皂苷、甘草酸、甘草次酸,甘草黄酮类的甘草总黄酮、甘草苷、异甘草素、光甘草定,以及甘草多糖。本文就这些活性成分的不同药理作用研究进展进行综述。

## 1 甘草皂苷类

### 1.1 甘草总皂苷

1.1.1 抗炎杀菌 甘草活性成分有较好的抗炎作用。研究表明甘肃野生甘草总皂苷可以抑制一氧化

- [4] 董柯,陈香美,汤力.水蛭对系膜增殖性肾炎蛋白尿、脂质代谢及凝血机制的影响[J].中华内科杂志,1995,34(4):250.
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:33.
- [6] 孙瑞涛,李黎丽,王铁良,等.肾宁水丸治疗系膜增生性肾小球肾炎的疗效观察[J].中医药学报,2007,35(6):39.
- [7] KURODA T, YOSHIDA Y, KAMIIE J, et al. Expression of MMP-9 in mesangial cells and its changes in anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats[J]. Clin Exp Nephrol, 2004, 8(3): 206.
- [8] KHACHIGIAN M, RESNICK N, GIMBRONE A Jr, et al. Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress.[J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 1169.
- [9] MORRISSEY J, KLAHR S. Transcription factor NF-kappaB regulation of renal fibrosis during ureteral obstruction[J]. Semin Nephrol, 1998, 18(6): 603.
- [10] RANGAN G, WANG Y, HARRIS D. NF-kappaB signalling in chronic kidney disease[J]. Front Biosci, 2009, 14: 3496.
- [11] 袁斌,汪受传,任现志,等.益气化痰法对大鼠系膜细胞增殖及细胞外基质分泌的影响[J].江西中医学院学报,2008,20(4):67.
- [12] 任现志,蒋淑敏,翟文生,等.黄芪、水蛭及其配方含药血清对大鼠系膜细胞生长周期及凋亡的影响[J].中医杂志,2009,50(3):255.
- [13] 任现志,汪受传,翟文生.黄芪、水蛭及其不同比例配方含药血清对大鼠系膜细胞外纤维连接蛋白和IV型胶原的影响[J].中华中医药杂志,2006,21(11):690.

**第一作者:**顾叶云(1993—),女,硕士研究生,中医儿科学专业。

**通讯作者:**任现志,博士,主任医师,博士研究生导师。renxzc@126.com

收稿日期:2018-11-12

编辑:吴宁