

·论著·

## 造血细胞生长抑制因子 抑制大鼠肾间质成纤维细胞的生长

肖慧捷

(北京大学第一医院儿科,北京 100034)

**[摘要]** 目的 观察一种新发现的生理性造血细胞生长抑制因子 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸 N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) 是否对大鼠肾间质成纤维细胞也具有一定程度的生长抑制作用。方法 应用成纤维细胞培养技术,将大鼠肾间质成纤维细胞在不同浓度的 AcSDKP 中共同孵育 24,48 h 后,测定其 alamar blue 的 OD 吸收值,观察不同浓度的 AcSDKP 对大鼠肾间质成纤维细胞的生长抑制作用。结果 大鼠肾间质成纤维细胞在 AcSDKP 中培养 48 h 后,测定其 alamar blue 的 OD 吸收值,发现其吸收率与对照组相比差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。说明 AcSDKP 确实对大鼠肾间质成纤维细胞具有一定程度的生长抑制作用,并且其抑制作用在一定浓度范围内呈现剂量依赖性,当 AcSDKP 的浓度高于  $10^{-5}$  mol/L 或低于  $10^{-8}$  mol/L 时,其抑制作用消失,最大抑制浓度为  $10^{-6}$  mol/L,最大抑制率约 33% ( $10^{-6}$  mol/L)。结论 生理性造血细胞生长抑制因子 AcSDKP 的抑制生长作用并不仅仅局限于造血细胞,它对大鼠肾间质成纤维细胞也具有生长抑制作用。

**[关键词]** 造血细胞生长抑制因子;肾间质成纤维细胞;大鼠

**[中图分类号]** R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)02-0158-03

## Antiproliferative Effects of the Hemoregulatory Inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on Rat Renal Interstitial Fibroblasts

XIAO Hui-Jie

Department of Pediatrics, First Hospital, Beijing University, Beijing 100034, China

**Abstract:** **Objective** To determine whether the tetrapeptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP), a physiological hemoregulatory inhibitor, has a biological function in non-hematopoietic cells (rat renal interstitial fibroblasts). **Methods** Cell proliferation was measured using standard cell culture techniques and the alamar blue colorimetric assay. **Results** OD measurement of alamar blue absorption at 48 h was significantly inhibited in fibroblasts exposed to  $1 \mu\text{mol}$  AcSDKP ( $P < 0.01$ ). During the 48-hour alamar blue absorption, only AcSDKP in concentrations of  $10^{-7}$  mol/L,  $10^{-6}$  mol/L, and  $10^{-5}$  mol/L had significant inhibiting effects compared to cells grown in the 5% FBS RPMI 1640 media alone. The inhibition was dose dependent, and disappeared at AcSDKP concentrations higher than  $10^{-5}$  mol/L or lower than  $10^{-8}$  mol/L. Maximum inhibition occurred at an AcSDKP concentration of  $10^{-6}$  mol/L (33% suppression). **Conclusions** The inhibiting effect of AcSDKP is not limited to hematopoietic cells. AcSDKP is specifically cleaved to an inactive form by the N-terminal active site of angiotensin converting enzyme (ACE) and ACE inhibitors (ACEI) can increase the concentration of AcSDKP. It suggests that AcSDKP may be an endogenous modulator of renal cell proliferation and the antiproliferative action of ACEI in renal diseases may be partly mediated by AcSDKP.

**Key words:** Inhibitor of hematopoietic cell proliferation; Renal interstitial fibroblasts; Rat

N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸 N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) 这一四

肽链是 Frindek 等<sup>[1]</sup>于 1977 年首次从胎生骨髓中提取的一种生理性造血细胞生长抑制因子,它可以

[收稿日期] 2000-08-09; [修回日期] 2001-01-15  
[基金资助] 日中医学学会世川医学奖学金基金资助(NO.026)  
[作者简介] 肖慧捷(1963-),女,硕士,副主任医师。

通过阻止原始造血干细胞进入 S 期,使其停留在 G<sub>0</sub> 期而发挥其生长抑制作用。随后研究发现 AcSD KP 对非造血细胞如淋巴细胞也有生长抑制作用<sup>[2,3]</sup>。但目前我们尚不知 AcSD KP 在肾脏细胞增生中是否起作用,本研究观察了 AcSD KP 对大鼠肾间质成纤维细胞的生长抑制作用。借以探索一种新的抑制肾脏细胞慢性增生的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

将在 - 70 ℃液氮内冻存的 SD 大鼠肾间质成纤维细胞复苏转种至 5 个 5 %胎牛血清的 RPMI 1640 培养基、直径为 90 mm 塑料培养皿中,放入 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱孵育。细胞培养孵育箱箱温为 37 ℃,含 5 % CO<sub>2</sub>,95 %空气。一般数小时即可见成纤维细胞贴壁,2 ~ 3 日布满皿底部,此时的成纤维细胞极纯,可用来作研究。(1640 培养基购自 GIBCOBRL G 公司)。

1.2 反应物

合成 AcSD KP:购自 BEXCO. L TD TOKYO 公司。用双蒸水将其配制成不同浓度。alar blue: 购自 Mfg. By Accu Med 公司。专利号 5,501.959。

1.3 成纤维细胞增生系列

将培养皿中成纤维细胞调配至 2.5 × 10<sup>4</sup> 的浓度,种植在 96 孔塑料细胞培养基中,将浓度分别为 10<sup>-9</sup> mol/L,10<sup>-8</sup> mol/L,10<sup>-7</sup> mol/L,10<sup>-6</sup> mol/L,10<sup>-5</sup> mol/L 的 AcSD KP 加入到培养皿中共同孵育 24 至 48 h 以上。

1.4 alamar blue 测定法

将与 AcSD KP 共同孵育 24 及 48 h 后的成纤维细胞培养基中,加入 alamar blue 共同孵育 4 h 后,用 Bio-RAD-Model 550 微板测定仪测定其吸光度(A) (吸收光谱 570 ~ 590 nm)。空白对照组:为成纤维细胞本身。

1.5 统计学分析

采用 t 检验法及 F 和 Duwnett 检验法。

2 结果

成纤维细胞在 AcSD KP 1 μmol/L 中孵育 48 h 后其吸光度(A)值,与对照组差异有非常显著性意义,说明 AcSD KP 对细胞的生长抑制作用在 48 h 后明显表现出来。成纤维细胞在 AcSD KP 1 μmol/L 的浓度中孵育 24 及 48 h 后,分别测定其吸光度(A)

值(取 8 个实验组及对照组测试值,取其测定值均数做统计分析),发现 24 h alamar blue 的吸光度(A)值与对照组差异无显著性意义(P > 0.05)。当孵育 48 h 后,其吸光度(A)值,与对照组差异有非常显著统计学意义(P < 0.01),(表 1,图 1)。说明 AcSD-KP 确实对细胞具有生长抑制作用。

不同浓度的 AcSD KP 对大鼠肾间质成纤维细胞的生长抑制作用不同,并且其抑制作用在一定浓度范围内呈现剂量依赖性。将成纤维细胞分别孵育在 10<sup>-9</sup> mol/L,10<sup>-8</sup> mol/L,10<sup>-7</sup> mol/L,10<sup>-6</sup> mol/L,10<sup>-5</sup> mol/L 的 AcSD KP 中,测定其 48 h 的吸光度(A)发现,当 AcSD KP 为 10<sup>-7</sup> mol/L,10<sup>-6</sup> mol/L,10<sup>-5</sup> mol/L 时与对照组差异有显著性意义(P < 0.05),当 AcSD KP 的浓度高于 10<sup>-5</sup> mol/L 或低于 10<sup>-8</sup> mol/L 时,其抑制作用消失,最大抑制浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L,最大抑制率约 33 %(表 2,图 2)。

表 1 成纤维细胞在 AcSD KP 1 μmol/L 中孵育 48 h 后吸光度(A)值

Table 1 OD measurements of fibroblasts exposed to 1 μmol/L AcSD KP (n = 8)

|                 |                           |                          |                          |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 成纤维细胞(对照)       | 89.80 ± 0.10              | 7.23 ± 0.22              | 3.57 ± 0.22              |
| 成纤维细胞 + AcSD KP | 91.59 ± 0.01 <sup>a</sup> | 5.34 ± 0.35 <sup>a</sup> | 2.07 ± 0.04 <sup>a</sup> |

注:a 与对照组比较 P < 0.01;n = 8 为 8 个实验组及对照组测试均值

表 2 AcSD KP 生长抑制作用在一定浓度范围内呈剂量依赖性

Table 2 AcSD KP inhibition was dose dependent.

| AcSD KP 浓度 (mol/L) | 10 <sup>-8</sup> | 10 <sup>-7</sup>    | 10 <sup>-6</sup>     | 10 <sup>-5</sup>     | 10 <sup>-4</sup> |
|--------------------|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| % (n = 8)          | - 4.21           | - 4.75 <sup>a</sup> | - 11.78 <sup>b</sup> | - 11.57 <sup>b</sup> | - 4.86           |

注:% 为实验组(成纤维细胞 + AcSD KP)与对照组(成纤维细胞自身)均值(n = 8)之差;a P < 0.05; b P < 0.01

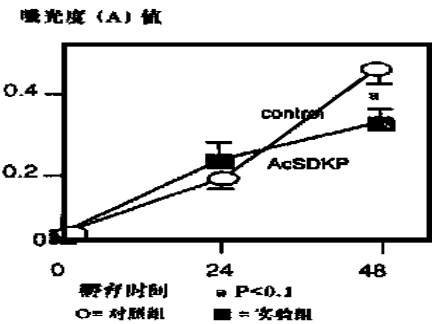


图 1 成纤维细胞在 AcSD KP(1 μmol/L)中孵育 48h 后吸光度(A)值

Figure 1 OD measurements of fibroblasts exposed to 1 μmol/L AcSD KP (n = 8)

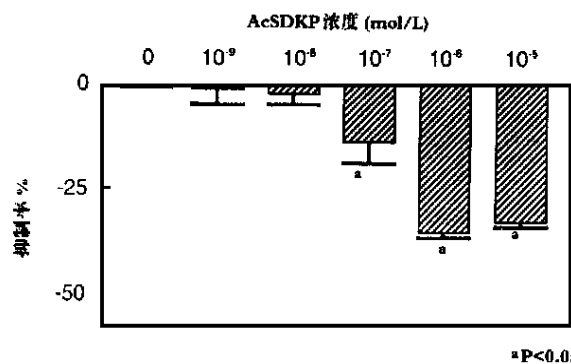


图 2 AcSDKP 生长抑制作用在一定浓度范围内呈剂量依赖性  
Figure 2 AcSDKP inhibition was dose - dependent.

3 讨论

在本研究中,我们观察了一种生理性造血细胞生长抑制因子 AcSDKP 对大鼠肾间质成纤维细胞的生长抑制作用。结果发现 AcSDKP 对肾间质成纤维细胞具有生长抑制作用,并且其抑制作用在一定浓度范围内呈现剂量依赖性。由于 AcSDKP 在体内是受血管紧张素转换酶(ACE)分解而失效,而血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)可以增加 AcSDKP 的浓度,故 Kotanko<sup>[4]</sup>等认为 ACEI 治疗肾移植术后红细胞增多症的机制是通过增加血中 AcSDKP 的浓度,使其抑制红细胞生成的作用增强<sup>[5]</sup>,从而达到降低红细胞数量的目的。

肾脏细胞增生是肾小球纤维化和硬化的早期病理过程。它受细胞增生调节因子影响。细胞生长与否取决于促生长因子与细胞生长抑制因子之间复杂的平衡调节。至今为止,我们对于细胞生长负性调

节因子所知甚少。在肾脏间质中成纤维细胞起骨架作用而且通过自分泌及旁分泌机制参与了肾小球纤维化及硬化过程。本研究表明 AcSDKP 的生长抑制作用不仅仅局限于造血干细胞,它对于肾脏间质中成纤维细胞也有生长抑制作用。因此,肾脏疾病慢性化进程中 AcSDKP 是否参与作用、ACEI 的肾脏保护作用是否与 AcSDKP 参与有关是一个很令人感兴趣的问题,本研究为阻滞肾脏细胞慢性增生、纤维化提供了一种新的思路和方法。

感谢:本研究主要在日本东京女子医科大学肾脏病中心完成,特此向老师岩本典子、吉冈俊正、白发宏司、伊藤克己感谢!

[参 考 文 献]

[1] Frindek E, Guigon M. Inhibition of CFU entry into cycle by a bone marrow extract [J]. Exp Hematol, 1977, 5(1): 74 - 76.

[2] Lenfant M, Wdzieczak-Bakala J, Guittet E, et al. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation. Purification and determination of its structure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(3): 779 - 782.

[3] Li J, Volkov L, Comt L, et al. Production and consumption of the tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of hematopoietic stem cells, by hematopoietic microenvironmental cells [J]. Exp Hematol, 1997, 25(2): 140 - 146.

[4] Kotanko P, Kotanko U. Postrenal transplant erythrocytosis: a possible role for testosterone, angiotension I converting enzyme, and N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline [J]. Clin Nephrol, 1996, 46(3): 217(letter).

[5] 王云彬, 闵志廉. 肾移植术后红细胞增多症研究现状 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(4): 382 - 384.

(本文编辑:曹励之)