

· 论 著 ·

低分子肝素抑制肾小球系膜细胞增生机制的研究

吴小川, 易著文, 肖建武, 何小解

(中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室, 湖南 长沙 410011)

【摘 要】 目的 低分子肝素是肾脏疾病治疗中常用药物,能抑制肾小球系膜细胞的增生,其机制尚不清楚,本研究探讨低分子肝素(LMWH)对大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)增生水平的影响及其机制。**方法** GMCs细胞共设3组:①GMCs组;②LPS组;即GMCs+LPS;③LMWH组;即GMCs+LPS+LMWH,而LMWH终浓度分别为2.5 IU/ml,25 IU/ml和250 IU/ml。采用MTT法于培养24 h和48 h观察各组中GMCs增生水平,选择药物的最佳GMCs增生抑制浓度及时间;采用免疫细胞化学方法观察培养48 h后3组(LMWH终浓度为250 IU/ml)GMCs涂片中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及核转录因子- κ B(NF- κ B)的表达;采用ELISA方法观察培养的上清液中MCP-1浓度。**结果** LMWH 250 IU/ml组对GMCs增生的抑制最为显著,其GMCs增生水平低于LPS组和LMWH 2.5 IU/ml,25 IU/ml组($P < 0.05$);各浓度LMWH对GMCs增生的抑制作用48 h强于24 h($P < 0.05$)。LMWH 250 IU/ml组48 h的MCP-1阳性率明显低于LPS组($P < 0.01$),而与GMCs组差异无显著性($P > 0.05$);LPS组48 h的MCP-1阳性率明显高于GMCs组($P < 0.01$)。LMWH 250 IU/ml组48 h的NF- κ B表达阳性率与LPS组和GMCs组比较差异均无显著性($P > 0.05$);LPS组的NF- κ B表达阳性率明显高于GMCs组($P < 0.01$)。LMWH 250 IU/ml组GMCs培养上清液中MCP-1浓度明显低于LPS组($P < 0.01$),与GMCs组差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** LMWH能抑制大鼠GMCs增生,明显下调GMCs中MCP-1的异常表达及分泌,而对NF- κ B活性无明显抑制。
[中国当代儿科杂志,2003,5(5):435-438]

【关 键 词】 低分子肝素;系膜细胞;核转录因子- κ B;单核细胞趋化蛋白-1

【中图分类号】 R692.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2003)05-0435-04

Mechanism of Inhibiting Rat Glomerular Mesangial Cells Proliferation by Low-Molecular-Weight Heparins

Xiao-Chuan WU, Zhu-Wen YI, Jian-Wu XIAO, Xiao-Jie HE. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: xiaochuanwu@yahoo.com)

Abstract: Objective Low-molecular-weight heparins (LMWH) can inhibit proliferation of glomerular mesangial cells (GMCs) and it is a major and effective drug in the treatment of renal diseases but the mechanism has still not been explained. This paper studies the mechanism by which LMWH inhibits monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression, secretion and regulation in rat GMCs. **Methods** Three groups were established: GMCs group, LPS group (GMCs + LPS) and LMWH group (GMCs + LPS + LMWH). GMCs proliferation was detected by MTT at 24 and 48 h after culture. MCP-1 and nuclear transcriptional factor of Kappa B (NF- κ B) expressions were assayed by immunohistochemistry at 48 h after culture. MCP-1 concentration was determined by ELISA. **Results** In the LMWH group with the terminal concentration of 250 IU/ml, the proliferative rate of GMCs was lower than that in the LPS group and was also lower than those in the LMWH groups with the terminal concentration of 2.5 IU/ml and 25 IU/ml respectively ($P < 0.05$). The proliferative inhibition of GMCs induced by LMWH of three different terminal concentrations was more significant at 48 h than at 24 h after culture. The positive rate of MCP-1 expression of GMCs in the LMWH group with the terminal concentration of 250 IU/ml was obviously lower than that in the LPS group at 48 h after culture ($P < 0.01$), but there was no statistical difference when compared with the concentration in the GMCs group. The positive rate of MCP-1 expression of GMCs in the LPS group was obviously higher than that in the GMCs

[收稿日期] 2003-01-15; [修回日期] 2003-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 39800140, 39970776)

[作者简介] 吴小川(1967-),男,博士,副教授。主攻方向:小儿肾脏病与免疫性疾病。

[通讯作者] 吴小川,湖南省长沙市人民中路86号湘雅二医院小儿肾脏病研究室,邮编:410011。

group ($P < 0.01$). There was no statistical difference in the NF- κ B expression at 48 h after culture between the LMWH group and LPS group as well as the GMCs group, while it was obviously higher in the LPS group than that in the GMCs group ($P < 0.01$). The MCP-1 concentration in the LMWH group with the terminal concentration of 250 IU/ml was significantly lower than that in the LPS group ($P < 0.01$) and did not differ from that in the GMCs group. **Conclusions** LMWH can obviously inhibit proliferation of GMCs, down-regulate the abnormal expression and secretion of MCP-1, but can not inhibit the activity of NF- κ B.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(5): 435 - 438]

Key words: Low-molecular-weight heparins; Mesangial cell; Nuclear transcriptional factor of kappa B; Monocyte chemoattractant protein-1

肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)增生是肾脏疾病常见的病理特征,抑制 GMCs 增生是治疗增生性肾脏病、防止病变恶化的关键环节^[1]。近年来的研究表明,趋化因子家族与肾脏疾病的发生有密切的关系。趋化因子家族 C-C 亚族中的单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的作用引起了人们的广泛关注。在正常人的肾组织中有少量 MCP-1 的表达,但在肾脏疾病中肾小球系膜区 MCP-1 表达增强,在肾缺血和药物性肾损害时,则出现肾间质内 MCP-1 明显增多,肾小球疾病中 MCP-1 的高表达与肾间质的免疫损伤、肾脏病理进展有关^[2,3]。核转录因子- κ B(nuclear transcriptional factor of kappa B, NF- κ B)是近年来研究较多的一种重要的生理调节因子,调控多种基因的表达,它的异常激活或完全抑制与多种疾病的发生有关^[4]。目前国内有低分子肝素(low-molecular-weight heparins, LMWH)治疗系膜增生性肾炎及局灶节段硬化性肾炎的报道^[5]。有资料证实,LMWH 对体外培养的 GMCs 的生长、细胞外基质及细胞因子有明显的抑制作用,从而减轻肾小球病变^[6-8]。但其作用机制尚不清楚,有文献报道肝素可抑制体外培养的内皮细胞产生 MCP-1^[9],从肾脏疾病的发生发展机制来看, NF- κ B 的中心调控作用与 MCP-1 分泌之间可能存在某种联系,但国内外未见 LMWH 对 GMCs 增生的抑制作用与 MCP-1 表达及 NF- κ B 调控关系的报道。本研究拟通过观察 LMWH 对大鼠 GMCs 增生的抑制作用,探讨 GMCs 中 MCP-1 的表达及调控机制,初步揭示这种内在联系。

1 材料和方法

1.1 大鼠 GMCs 培养

采用大鼠肾小球系膜细胞系(上海长征医院梅长林教授惠赠),培养液由 20% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素、RPMI 1640 组成,培养瓶置于 5% CO₂、18% O₂ 孵箱内,当系膜细胞长至贴壁时,用 0.25% 胰蛋白酶与 0.04% 乙二胺四乙酸二钠等量

混合,消化细胞,传代,实验取第 3 代细胞。

1.2 大鼠 GMCs 增生水平的测定

采用 MTT 掺入法, GMCs 种入 96 孔板中, 4×10^3 个细胞/200 μ l。实验组每孔加入 LPS(美国 Sigma 公司产品)终浓度 5 mg/L, LMWH(杭州赛诺菲民生制药有限公司)终浓度分别为:2.5, 25 和 250 IU/ml, 每种浓度分别设 5 个复孔。设 GMCs + LPS 和 GMCs 空白对照二组。5% CO₂ 孵箱, 37℃ 培养至设定 24 h 和 48 h, 在设定时间结束前 4 h, 加入 5 mg/ml MTT(美国 Sigma 公司产品)10 μ l/孔, 放入 5% CO₂ 孵箱, 37℃ 培养 4 h, 甩去上清, 每孔加入 DMSO(二甲基亚砷)200 μ l, 用酶联免疫吸附检测仪(波长 570 nm)测量。

1.3 大鼠 GMCs 涂片

将培养的大鼠 GMCs 分成 3 组, LMWH(250 IU/ml) + LPS + GMCs 组; LPS + GMCs 组; GMCs 组。上述 3 组于 48 h 用 D-Hank's 洗 3~4 次/瓶, 每瓶加 4~5 滴 0.125% 胰酶消化 3 min, 加完全培养基 3~5 ml/瓶中中止消化, 打匀, 装入试管瓶中, 置入低速离心机内离心, 去掉上清, 细胞沉淀涂片, 风干, 4% 多聚甲醛固定 30 min 备用。

1.4 GMCs 中 MCP-1 及 NF- κ B 表达的测定

将已经细胞涂片的玻片 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% TritonX-100 泡洗破膜, 微波修复抗原后, 滴加抗原修复液, 室温下 10 min, 滴加正常血清封闭液(为二抗同种动物血清, 用于组织切片封闭)室温下 20 min, 甩去多余液体(不洗), 滴加适当稀释的 MCP-1 抗体(1:300)或 NF- κ B 抗体(1:100)(IgG), 37℃ 温箱 50 min, 滴加生物素化山羊抗鼠 IgG, 滴加链酶亲和素-生物素过氧化物酶复合物(SABC), DAB 显色, 显微镜下观察, 分别在每张涂片中的 5 个视野内计数所有 GMCs 的免疫染色阳性细胞数目和阴性细胞数目。

1.6 GMCs 培养上清液 MCP-1 浓度测定

将包被液, 即碳酸氢盐缓冲液 20 ml 与 50 μ l Anti-Rat MCP-1 混合液用微量加样器加至 96 孔板中, 每孔加 100 μ l, 4℃ 过夜, 倒掉孔液, 每孔用微量

加样器加上清液 100 μ l,置 37℃ 2 h,小牛血清白蛋白(BSA)封闭 37℃ 30 min,拍干,加酶结合物(二抗,亲和纯化抗体,标记长臂生物素)IgG 入孔中,每孔 100 μ l,37℃ 2 h,显色试剂每孔 100 μ l 15 min,4 mol/L H₂SO₄ 终止液每孔 50 μ l,用酶联免疫吸附检测仪(ELX-800)测吸光度(A)值,波长 450 nm。

1.7 统计分析

所有统计应用 SPSS 10.0 统计软件包处理。采用 One-Way ANOVA 及 Chi-square test 进行两两比较,方差齐者采用 LDS 检验,方差不齐者采用 Tamhane 检验。

2 结果

2.1 LMWH 对大鼠 GMCs 增生水平的影响

LMWH 浓度为 250 IU/ml 时,24 h 和 48 h GMCs 增生水平低于 LMWH 2.5 U/ml,25 U/ml 组、LPS 组 ($P < 0.05$)。各浓度 LMWH 对大鼠 GMCs 增生水平的抑制均以 48 h 强于 24 h ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 LMWH 对大鼠 GMCs 增生水平的影响

Table 1 Effect of LMWH on the proliferation of GMCs ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
GMCs 组	0.948 $\pm$ 0.057	0.650 $\pm$ 0.053
LPS 组	0.948 $\pm$ 0.131	0.696 $\pm$ 0.112
LMWH2.5 IU/ml 组	0.930 $\pm$ 0.114	0.677 $\pm$ 0.120 ^b
25 IU/ml 组	0.871 $\pm$ 0.136	0.567 $\pm$ 0.116 ^b
250 IU/ml 组	0.502 $\pm$ 0.129 ^a	0.349 $\pm$ 0.046 ^{a,b}

注: a 与 LMWH 2.5 IU/ml,25 IU/ml 及 LPS 组比较 $P < 0.05$; b 与同组 24 h 比较 $P < 0.05$

2.2 LMWH 组、LPS 组、GMCs 组 MCP-1 的表达

在 48 h,LMWH 250 IU/ml 组的 MCP-1 表达阳性率明显低于 LPS 组 ($P < 0.01$);而与 GMCs 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。LPS 组的 MCP-1 表达阳性率明显高于 GMCs 组 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 3 组 48 h MCP-1 表达的比较

Table 2 Comparisons of MCP-1 expression of the 48th hour in 3 groups

组别	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)
GMCs 组	75	112	40.1
LPS 组	135	108	55.6 ^b
LMWH 250 IU/ml 组	66	120	35.5 ^a

注: a 与 LPS 组比较 $P < 0.01$; b 与 GMCs 比较 $P < 0.01$

2.3 LMWH 组、LPS 组、GMCs 组 NF- κ B 的表达

在 48 h,LMWH 250 IU/ml 组 NF- κ B 表达阳性率分别与 LPS 组和 GMCs 组比较均无统计学差异 (均 $P > 0.05$);LPS 组 NF- κ B 表达阳性率明显高于 GMCs 组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 48 h LMWH 250 IU/ml 组的 NF- κ B 表达与对照组的比较

Table 3 Comparisons of positive rates of NF- κ B expression of the 48th hour in 3 groups

组别	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)
GMCs 组	99	239	29.3
LPS 组	165	197	45.6 ^a
LMWH 250 IU/ml 组	80	125	39.0

注: a 与 GMCs 比较 $P < 0.01$

2.4 GMCs 培养上清液 MCP-1 浓度测定

48 h 各组 GMCs 培养上清液中 MCP-1 的浓度见表 4。LPS 组 MCP-1 浓度高于 GMCs 组,LMWH 组 MCP-1 浓度明显低于 LPS 组 ($P < 0.01$),与 GMCs 组比较无统计学差别 ($P > 0.05$)。

表 4 48 h 不同组别的 MCP-1 浓度 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Table 4 MCP-1 level of the 48th hour in 3 groups

组别	例数	MCP-1 浓度
GMCs 组	6	0.2015 $\pm$ 0.0828
LPS 组	6	0.6493 $\pm$ 0.0374 ^b
LMWH 250 IU/ml 组	6	0.1475 $\pm$ 0.0243 ^a

注: a 与 LPS 组比较 $P < 0.01$; b 与 GMCs 组比较 $P < 0.01$

3 讨论

系膜细胞增生及炎症介质的释放在肾脏疾病的发生、发展及肾小球硬化中具有重要的作用,临床上通过药物抑制细胞增生及炎症介质的释放是阻断肾脏病变进展的关键环节之一。我们在这一实验中证实 LMWH 组对大鼠 GMCs 增生有显著性抑制作用,其抑制作用随 LMWH 浓度的增高而增强。

MCP-1 是一种主要的单核细胞趋化因子。GMCs 在多种因素刺激下,MCP-1 表达增强,促使肾间质炎症细胞浸润,导致炎症反应。MCP-1 尚能刺激单核细胞产生白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6)等,从而刺激 GMCs 增殖,加重组织损害。应用抗-Thy 肾炎模型发现,当诱导肾炎后 30 min,MCP-1 及其 mRNA 表达开始增加,24 h 达到峰值后减少,在 5~21 d 时表达再度增加,MCP-1

的表达似乎与免疫复合物形成、系膜溶解和增生的发生相平行^[10]。我们在这一实验中,发现 LMWH 对 LPS 组 MCP-1 的表达、分泌具有明显抑制作用。

Ruiz-Ortega 等在培养的鼠系膜细胞中发现,血管紧张素 II (Ang II) 可活化 NF- κ B 并促使系膜细胞 MCP-1 的 mRNA 表达,用 NF- κ B 特异性抑制剂吡咯二硫氨基甲酯(PDTC)可消除 NF- κ B 的活性及抑制系膜细胞 MCP-1 的 mRNA 表达^[11]。用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)可抑制 NF- κ B 活性及 GMCs MCP-1 mRNA 的表达,表明在肾脏内 Ang II 可能通过 NF- κ B 激活调控 MCP-1 的 mRNA 表达,导致单核细胞聚集^[12]。但本实验发现,LMWH 对 NF- κ B 表达阳性率没有明显影响,说明 LMWH 对 GMCs 增生的影响与 NF- κ B 活化没有明显关系。有研究表明,LMWH 抗炎作用的机制可能为:阻止多形核白细胞和淋巴细胞迁移,并降低炎症细胞活性;抑制肥大细胞产生肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-4(IL-4),抑制 GMCs 分泌 IL-6 和 MCP-1。LMWH 抑制 GMCs 增生及 MCP-1 表达的机制是否与此有关有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 易著文. 小儿临床肾脏病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1998, 273-287.
- [2] Paolo S, Grandaliano G, Gesual L, Ranieri E, Schena FP, et al. Low-density lipoproteins enhance transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression induce cyclosporin in human mesangial cells [J]. Clin Exp Immunol, 1999, 117(2): 355-360.
- [3] Rovin BH, Yoshimura T, Tan L. Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells [J]. J Immunol, 1992, 148(7): 2148-2153.
- [4] Duque N, Go'mez-Guerro C, Egidio J. Interaction of IgA with Fc α receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor- κ B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10 [J]. J Immunol, 1997, 159(7): 3474-3482.
- [5] 陈香美,徐启河. 肝素治疗肾小球疾病的机理研究进展 [J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(5): 331-333.
- [6] 张明,郭慕依,金惠铭. 肝素对肾脏系膜细胞的抑制作用 [J]. 中国病理生理杂志, 1995, 11(4): 443-446.
- [7] 刘晓惠,屈燧林,邱红渝,杨立川. 肝素对脂多糖诱导人肾小球系膜细胞增殖及细胞因子分泌的影响 [J]. 华西医科大学学报, 2000, 31(1): 77-79.
- [8] 张信,谌贻璞,李美花,高进,王海燕. 低分子肝素对肾小球系膜细胞及细胞外基质作用的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17(1): 27-29.
- [9] Douglas MS, Alis, Rix DA, Zhang JG, Kirby JA. Endothelial production of MCP-1: modulation by heparin and consequences for mononuclear cell activation [J]. Immunology, 1997, 92(4): 512-518.
- [10] Wenzel UA, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis [J]. Kid Inter, 1997, 51: 770-776.
- [11] Danial J, Antwerp V, Martin SJ. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B [J]. Science, 1996, 274(1): 787-789.
- [12] Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten Years After [J]. Cell, 1996, 87(4): 13-20.

(本文编辑:俞燕)

· 消息 ·

《中国医学文摘·儿科学》2004 年征订启事

《中国医学文摘·儿科学》是卫生部主管的国内医学文摘系列之一,创刊于 1982 年,先后 5 次荣获全国科技情报检索刊物评比三等奖。

本刊引用国内医学期刊 260 余种,文体采用文摘、摘要、题录及综述形式。目录按疾病分类编排,年终附有主题索引和作者索引。集儿科学术之精华,展儿科进展之全貌,具有言约意赅,检索方便的特点,是儿科临床、教学、科研工作者必备读物。中国标准刊号:ISSN-1001-1358, CN 21-1160/R, 国外总发行:中国国际图书贸易公司,邮发代号:6787BM。双月刊,大 16 开本,64 页,单价 6.30 元,全年定价 37.8 元。邮发代号 8-162。全国各地邮局均可订阅,亦可与我刊编辑部订购,地址:沈阳市苏家屯乔松路 2 号《中国医学文摘·儿科学》杂志社,魏赤平收。邮编:110101,电话:024-89800910, 89800434, 传真:024-89800920。Email: Ekxbjblin@yahoo.com.cn。

《中国医学文摘·儿科学》杂志社