

· 基础研究 ·

商陆皂苷甲对 IL-1 β 诱导的肾小球系膜细胞增殖及 CDK2、P27 的影响*

张祥贵, 汤杰印

(遵义医学院第五附属医院肾内科, 广东珠海 519100)

摘要:目的 观察商陆皂苷甲(EsA)对白细胞介素(IL)-1 β 诱导的大鼠肾小球系膜细胞(rGMC)增殖和细胞周期依赖性蛋白激酶(CDK2)及其抑制蛋白(P27)表达的影响。方法 噻唑蓝(MTT)法检测 EsA 对 rGMC 增殖与毒性的影响;碘化丙啶(PI)染色法,流式细胞仪检测细胞周期;蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 CDK2、P27 的表达。结果 观察剂量中 EsA 对 rGMC 没有细胞毒作用,EsA(2.5~5.0 mg/L)作用 rGMC 48 h 后明显抑制其增殖;IL-1 β 减少了 rGMC 的 G₁ 期细胞数并增加了 S 期的细胞数,促进了 rGMC 的 CDK2 的表达,抑制了 P27 的表达;EsA 增加了 IL-1 β 诱导的 rGMC 的 G₁ 期的细胞数并减少了 S 期的细胞数,抑制了 IL-1 β 诱导的 rGMC 的 CDK2 的表达,并促进了 P27 的表达。结论 rGMC 可能是 EsA 的作用靶细胞,EsA 通过抑制 CDK2 及激活 P27 的表达抑制了 IL-1 β 诱导的 rGMC 的增殖,阻滞了细胞周期的进程。

关键词:肾小球系膜细胞;细胞增殖;细胞周期;商陆皂苷甲

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)21-2496-04

Influence of esculentoside A on proliferation and CDK2 of IL-1 β induced glomerular mesangial cell*

Zhang Xianggui, Tang Jieyin

(Department of Nephrology, the Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519100, China)

Abstract: Objective To observe the effect of esculentoside A (EsA) on the proliferation and expression of CDK2 and P27 of rats glomerular mesangial cell. **Methods** rGMC was cultured in vitro, The cell growth and cell toxicity were detected by MTT assay; rGMC proliferation was observed by Rnase/PI-Flous; The expression of CDK2 and P27 were measured by Western blotting. **Results**

EsA at observed dose has not apparent cytotoxicity effect on rGMC. EsA (2.5-5.0 mg/L) inhibited the proliferation of rGMC after 48h. EsA increased the number of the G₁ phase and reduced the number of the S phase of IL-1 β induced rGMC. At the same time, EsA inhibited the expression of CDK2 and promoted the expression of P27 of IL-1 β induced rGMC. **Conclusion** The GMC is one of the mainly target cell which EsA bring therapeutic action. EsA inhibited proliferation of IL-1 β induced the GMC, inhibited the expression of CDK2 and activated the expression of P27 may be its mechanism.

Key words: mesangial cells; cell proliferation; cell cycle; esculentoside A

肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC), 正常时几乎不增殖, 炎症时被活化而增殖, 引起细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增加, 并释放各种生物活性物质, 终致肾小球硬化及终末期肾脏病(ESRD)。GMC 增殖是狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)等多种肾小球疾病的共同病理表现。商陆皂苷甲(esculentoside A, EsA)是从商陆块根中提纯的三萜皂苷, 有调节免疫、抗炎、抑制细胞增殖和促凋亡的作用^[1-2], 对自身免疫性肾炎动物模型疗效显著^[3-4], 本课题组前期研究发现, EsA 可显著抑制狼疮模型小鼠(BXSB)血清中炎症因子的表达, 抑制了肾组织的增殖并促进了其凋亡, 改善了肾脏的病理^[5-8]。本实验用大鼠肾小球系膜细胞(rat glomerular mesangial cell, rGMC)为对象, 探讨 EsA 对体外培养的 rGMC 增殖影响及其机制, 为其治疗系膜增殖性肾病提供实验和理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 rGMC 细胞株(HBZY-1)由中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供; EsA(上海同田公司), 批号: 10072431, 白

色粉剂(不溶于水), 于实验前溶于 0.1% DMSO 溶液中; IL-1 β (Prospec 公司), 生产批号: # 407IL1B01; 噻唑蓝[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、胰酶购自 Sigma 公司; MEM 培养液(Genom 公司); 优级胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司; 细胞周期与凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究; 兔抗大鼠细胞周期素依赖性激酶抑制剂(P27)、细胞周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)购自武汉博士德公司; Actin 单克隆抗体(Santa Cruz)、HRP 标记山羊抗兔(KPL)、PVDF Western 转印膜(Millipore)、流式细胞仪(FACS Vantage DiVa, BD)、酶标仪(ELX800)购自 Bio-Tek Instruments INK(美国)公司。

1.2 方法

1.2.1 rGMC 培养 rGMC 购回后于倒置显微镜下见细胞呈梭形生长, 铺满瓶底, 培养液透明清亮, 适应性培养 4 h 后吸取全部培养液(5% FBS 的 MEM)入无菌瓶内, 并将 FBS 浓度由 5% 调整为 10% 做 rGMC 培养备用。用磷酸盐缓冲液(PBS)清

* 基金项目: 贵州省科技厅联合基金(黔科合 J 字 LKZ [2012]12 号)。 作者简介: 张祥贵(1963~), 副主任医师, 本科, 主要从事慢性肾炎治疗研究。

洗细胞 2 次,加入胰酶(含 0.25%胰蛋白酶、0.02% 乙二胺四乙酸和酚红)消化细胞,见细胞变圆,呈片状脱落时,加入 10% FBS 的 MEM,终止消化,将细胞悬液移入离心管中,800 r/min,4 min 离心后,弃去上清液,加入 3 mL 10% FCS 的 MEM 培养液重悬细胞,按 1:3 接种于 25 mm² 培养瓶,每瓶加入 10% FBS 的 MEM 培养液至 5 mL,吹打均匀,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,2 d 换 1 次液,细胞生长迅速,3 d 传 1 次代。本实验采用 6~9 代 rGMC。

1.2.2 MTT 法测定不同浓度 DMSO 对 rGMC 增殖影响 本实验欲用 DMSO 溶解 EsA,故需先选择合适浓度的 DMSO,使其对 rGMC 增殖无影响又能充分溶解 EsA。取对数生长期 rGMC,用胰酶消化,离心收集细胞弃上清液,用 10% FBS 的 MEM 培养液将细胞浓度调制 1×10⁴/mL,每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板,37 °C,5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,换用无血清的 MEM 培养液培养 rGMC 24 h,使细胞同步化生长于 G₀ 期。对照组加入 10% FBS 的 MEM 培养液,实验组除加入上述培养液外,还分别加入终浓度为 1.2%、1.0%、0.8%、0.5%、0.1% 的 DMSO,上述各组分别培养至 24、48、72 h 时,换新鲜培养液,每孔加入 0.5% MTT 20 μL,继续培养 4 h 后,吸弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测定各孔吸光值(OD 值)。实验重复 4 次。

1.2.3 MTT 法测定不同浓度 EsA 对 rGMC 增殖的影响 按上述培养方法,取对数生长期 rGMC 接种于 96 孔培养板,培养箱中孵育 24 h 后使 rGMC 同生长于 G₀ 期。对照组加入 10% FBS 的 MEM 培养液,实验组除加入上述培养液外,还分别加入终浓度为 20.00、10.00、5.00、2.50、1.25、0.63 mg/L 用 DMSO 溶解的 EsA,上述各组分别培养至 24、48 及 72 h 时,换新鲜培养液,按上述方法加入 MTT 培养 4 h 后,加入 DMSO 振荡 10 min 溶解结晶物,在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测定各孔 OD 值。实验重复 4 次。

1.2.4 MTT 法测定 EsA 对 rGMC 毒性影响^[9] 方法同上,在无血清同步后行药物干预时,各组均改为无血清的 MEM 培养液。

1.2.5 流式细胞仪检测 EsA 对 IL-1β 诱导的 rGMC 周期 取对数生长期的 rGMC,用 10% FBS 的 MEM 培养液调整细胞浓度 0.5×10⁵/mL,2 毫升/孔细胞悬液,接种于 6 孔板,置入 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,换为 MEM 培养液继续培养 24 h,使细胞生长同步化,弃去上清液,分为正常对照组:加入 5% FBS 的 MEM 培养液;IL-1β 组:5% FBS 的 MEM 培养液含终浓度 10 μg/L 的 IL-1β 溶液;IL-1β+EsA 组:5% FBS 的 MEM 培养液含终浓度 10 μg/L 的 IL-1β、5 mg/L 的 EsA 溶液。每组设 4 个复孔,继续培养 48 h,收集细胞,1 000 r/min,4 min 离心去上清液,重悬于 4 °C 预冷的 PBS 液中,1 000 r/min,4 min 离心去上清液,加入 70% 冰浴预冷的乙醇重悬、固定细胞,4 °C 过夜。检测前,PBS 洗涤细胞 2 次,每个样本加 10 μL RNase(50×)、25 μL PI(20×)和 0.5 mL 染色缓冲剂,37 °C 避光孵育 30 min,滤过网过滤,上流式细胞仪检测,用 Modfit 软件分析数据。实验重复 4 次。

1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 CDK2、P27

的表达 提取按上述方法接种、培养、分组作用 48 h 后各组细胞总蛋白,每组 1×10⁶ 个细胞,用 Bradford 法测定蛋白质浓度,并置于-20 °C 备用。每个样品取 30 μg 蛋白质加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液使其终浓度成为 1×,100 °C 煮沸 5 min,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶 45 V 40 min,分离胶 120 V 90 min)后,200 mA 电转移转至 PVDF 膜 1 h,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入稀释的 P27(1:400)、CDK2(1:400)一抗和 actin 单克隆抗体(1:1 000),室温下孵育 2 h,TBST 洗膜,加 1:3 000 TBST 稀释的二抗室温孵育 45 min,TBST 洗膜,加入等体积混溶的 A、B 化学发光试剂,保持 1.5 min,去尽残液,曝光成像。照片用 GelDoc 2000 凝胶成像系统进行分析,确定杂交条带的光密度值,用各组的光密度值/内参照光密度值进行统计学分析,实验重复 3~5 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用方差分析;多个样本均数的两两比较,方差齐性者用 LSD-t 检验,方差不齐者用 Tamhane's T2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾小球系膜细胞生长形态观察 rGMC 经传代 24 h 后几乎全部伸展贴壁,生长迅速,约 2~3 d 铺满瓶底。在倒置显微镜下观察,rGMC 呈梭形、不规则形、纺锤形、胞核居细胞中央呈卵圆形,胞体多突起,生长密集时,细胞接触间隙可消失,见图 1。

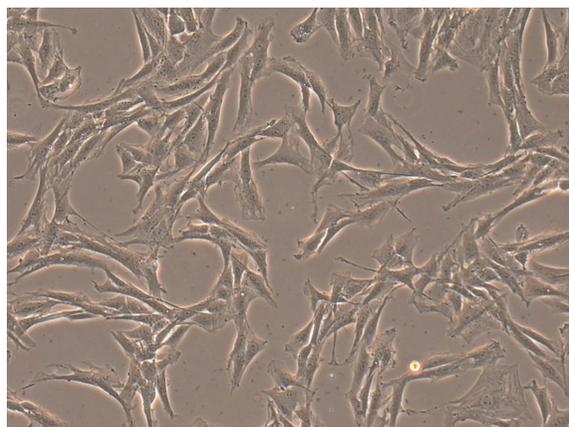


图 1 正常培养的肾小球系膜细胞形态(×200)

表 1 不同 EsA 浓度在不同时间点对 rGMC 增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

ESA 浓度(mg/L)	OD(24 h)	OD(48 h)	OD(72 h)
0.000	0.529±0.081	0.808±0.021	1.331±0.219
20.000	0.547±0.362	0.863±0.903	1.218±0.165
10.000	0.547±0.097	0.880±0.080	1.330±0.146
5.000	0.508±0.018	0.642±0.060*	0.966±0.325*
2.500	0.478±0.043	0.716±0.081#	1.032±0.123#
1.250	0.479±0.026	0.815±0.056	1.271±0.185
0.625	0.473±0.053	0.805±0.041	1.232±0.218

*:P<0.01, #:P<0.05,与 EsA 浓度为 0.000 mg/L 比较。

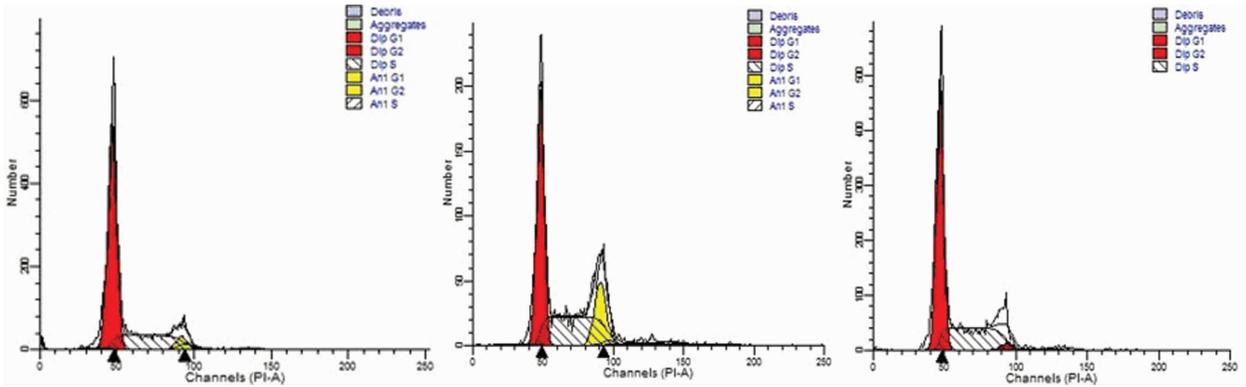
2.2 DMSO 对 rGMC 增殖的影响 与未加 EsA 比较,0.1%

DMSO 对 rGMC 在 24、48、72 h 的细胞增殖无明显抑制作用, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各组对 rGMC 的细胞增殖在 24、48、72 h 的, 3 个时间点或者某 1~2 个时间点有明显的影响, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 故宜用 0.1% DMSO 溶解 EsA。

2.3 EsA 对 rGMC 的毒性影响 与未加 EsA 比较, EsA 浓度在 0.625~20.000 mg/L 间, EsA 对 rGMC 活力无明显抑制作用, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 EsA 对 rGMC 的增殖影响 与未加 EsA 比较, EsA 浓度为 2.50~5.00 mg/L, 在 48、72 h, 明显抑制了细胞的增殖 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 1。

2.5 EsA 对 IL-1 β 诱导的 rGMC 细胞周期的影响 与正常对照组比较, IL-1 β 组 rGMC 的 S 期细胞比例明显增多 ($P < 0.05$), G₀/G₁ 期细胞比例明显减少 ($P < 0.05$), 促进了 rGMC 的增殖; 与 IL-1 β 组比较, IL-1 β 联合 EsA 组 rGMC 的 G₀/G₁ 期细胞比例明显增多 ($P < 0.05$), S 期细胞比例明显下降 ($P < 0.05$), 对 IL-1 β 诱导的细胞增殖有显著的抑制作用; 与正常对照组比较, IL-1 β +EsA 组 G₀/G₁ 期细胞比例有所减少, S 期细胞比例有所增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), EsA 可将 IL-1 β 诱导的 rGMC 增殖抑制至正常范围。3 组均未见凋亡峰, 无明显的细胞坏死和晚期凋亡, 见图 2。



A: 正常对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +EsA 组。

图 2 EsA 对 rGMC 细胞周期分的影响

2.6 EsA 对 IL-1 β 诱导 rGMC 的 CDK2、P27 表达的影响 与正常对照组比较, IL-1 β 组 CDK2 表达明显增强 ($P < 0.01$), P27 表达明显减弱 ($P < 0.01$); 与 IL-1 β 组比较, IL-1 β 联合 EsA 组 CDK2 表达明显减弱 ($P < 0.01$); P27 表达明显增强 ($P < 0.01$); 与正常对照组比较, IL-1 β +EsA 组 CDK2、P27 表达明显增强 ($P < 0.01$). 见图 3。

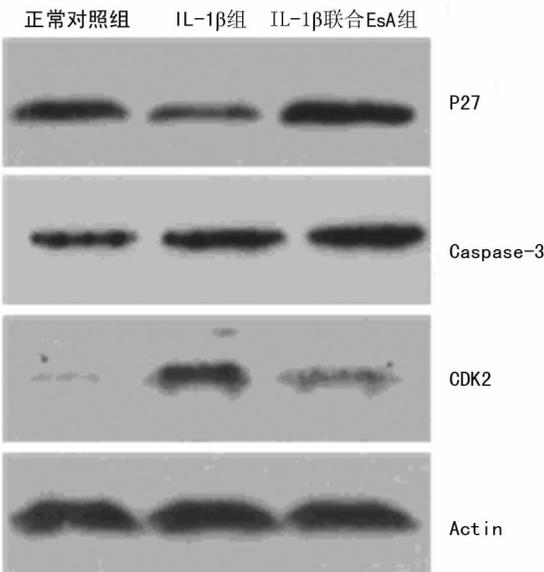


图 3 各组 rGMC 的 CDK2、P27、Caspase-3 的表达情况

3 讨论

EsA 是从中国商陆块根中提纯的一种三萜类皂苷化合

物, 本实验组前期研究表明 EsA 具有抗炎、抑制细胞增殖和促凋亡的作用。由于 LN 的主要病理变化是 GMC 增殖, 为明确 EsA 在 LN 等系膜增殖性肾炎肾组织中的作用靶点及机制, 考虑 IL-1 β 是活化 GMC 的主要炎症因子之一, 且具有典型性, 建立了体外 IL-1 β 诱导 GMC 增殖的模型, IL-1 β 作用后促进了 rGMC 增殖, 表明 IL-1 β 诱导的 GMC 增殖模型符合实验所需。

细胞增殖和毒性实验结果显示 EsA (2.5~5.0 mg/L) 对血清诱导的 rGMC 增殖 48~72 h 有显著的抑制作用, 实验研究浓度范围内 EsA 无明显引起 rGMC 坏死, 提示 GMC 是 EsA 作用的靶细胞, 抑制细胞增殖不是通过细胞毒作用。

细胞增殖是通过细胞周期实现的, 细胞周期调节蛋白在细胞周期水平最终决定细胞的命运^[10], 其分为细胞周期正控蛋白和负控蛋白, 正控蛋白包括细胞周期素 (cyclin) 和 CDK, 负控蛋白主要是细胞周期素依赖性激酶抑制剂 (cyclin-kinase inhibitor, CKI)。

CDK2 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在细胞周期 G₁ 期和 S 期分别与 Cyclin E 和 Cyclin A 结合, 形成全酶活性的周期素, 促进细胞周期度过 G₁ 期和 S 期。正常 rGMC 静止期 CDK2 表达水平极低, 病理状态下 GMC 增生同 CDK2 表达增加显著相关^[11]。P27 是细胞周期调节负控蛋白 CIP/KIP 家族成员之一, P27 以同源的 N 末端与 Cyclin-CDK 复合物中的 CDK 结合, 抑制其磷酸激酶活性, P27 表达增强时细胞停滞在 G₁ 期, 抑制其增殖^[12]。研究证实 P27 是肾脏对免疫和非免疫损伤反应的至关重要的决定者, 是调控 GMC 增生的一个关键因素^[13]。

本实验结果显示,EsA 可抑制了 IL-1 β 诱导的 rGMC 增殖,可能机制是 EsA 激活并促进了 rGMC 的 P27 表达,使其抑制了 CDK 磷酸激酶活性,从而降低了 Cyclin-CDK 复合物活性,同时也下调了 CDK2 的表达,减少了 Cyclin-CDK2 复合物的生成,进而延缓了细胞周期的进程及抑制了细胞的生长,抑制了 GMC 的炎症,减缓了其硬化,改善了肾脏的病理表现,改善了系膜细胞增殖性肾小球疾病的病情,说明了 EsA 在系膜增殖性肾脏病中具有一定的应用前景,为临床运用 EsA 提供了一定的实验基础和理论依据。EsA 在体外作用和经体内生物转化对细胞的作用是否同等,有待于今后进一步研究。

参考文献:

[1] Zhen XY, Su Y, Yang SM, et al. Protective effect of esculentoside A on radiation-induced dermatitis and fibrosis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65(3): 882-889.

[2] 邓俐, 张德堂, 杜江. 商陆皂苷甲对体外培养的人角质形成细胞增殖的影响[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2006, 20(11): 655-657.

[3] 张亮, 张克非, 吴雄飞. 商陆皂苷甲对大鼠抗 Thy1 系膜增殖性肾炎的治疗作用[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(6): 506-508.

[4] Hu ZL, Qiu L, Xiao ZY, et al. Effects of esculentoside A on autoimmune syndrome induced by campylobacter jejuni in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(1): 65-71.

[5] 马华林, 张欣洲, 张祥贵. 商陆皂苷甲治疗 BXS 狼疮性

肾炎小鼠的实验研究[J]. *广东医学*, 2011, 32(12): 1540-1542.

[6] 杨丹. 商陆皂苷甲对 BXS 小鼠肾脏细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[D]. 遵义: 遵义医学院, 2010.

[7] 孟令国. 商陆皂苷甲对 BXS 小鼠肾组织 PCNA, Caspase-3, Fas 和 FasL 表达的影响[D]. 遵义, 遵义医学院, 2011.

[8] Ma HL, Zhang XG, Zhang XZ, et al. The effect of esculentoside A on lupus nephritis-prone BXS mice [J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(2): 354-360.

[9] 祝正明, 孙建实, 赵湘. 三七总皂苷对大鼠肾小球系膜细胞增殖及细胞凋亡的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2007, 8(8): 471-472.

[10] 刘书馨, 陈香美. 系膜细胞增殖与细胞周期调节蛋白[J]. *中国药物与临床*, 2007, 7(4): 247-249.

[11] 余荣杰, 杨慧标, 赵景宏, 等. 缬沙坦对 Thy1 肾炎大鼠肾小球系膜细胞 CDK2 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2007, 8(2): 81-83.

[12] 傅博, 张四方, 卓莉, 等. 雷帕霉素对肾小球系膜细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中华肾病杂志*, 2009, 25(11): 849-852.

[13] Kim SM, Kim N, Lee S, et al. TGF-beta1-induced PINCH-1-ILK-alpha-parvin complex formation regulates mesangial cell proliferation and hypertrophy[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(4): 514-523.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-03-15)

(上接第 2495 页)

立及转移机制的探讨[D]. 上海: 上海复旦大学肝癌研究所, 2004.

[4] 李侃. 应用细胞遗传学方法检测口腔鳞状细胞癌染色体畸变[J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(2): 83-84.

[5] 陈万涛, 冯元勇, 蒋灿华, 等. 大鼠颊黏膜鳞状细胞癌单克隆细胞系 Rca-B 的建立及其生物学特性研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2007, 42(8): 477-482.

[6] Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia[J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(4): 365-374.

[7] 陈万涛. 4-硝基喹啉-1-氧化物诱发大鼠舌黏膜鳞癌模型和分子发病机制研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2010, 3(7): 10-13.

[8] Kademani D, Bell RB, Schmidt BL, et al. Oral and maxillofacial surgeons treating oral cancer: A preliminary report from the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Task Force on Oral Cancer[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 66(10): 2151-2157.

[9] Nagini S, Letchoumy PV, A T, et al. Of humans and hamsters: a comparative evaluation of carcinogen activation,

DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas[J]. *Oral Oncology*, 2009, 5(6): e31-37.

[10] 邱存平, 温玉明, 王昌美. 金黄地鼠舌癌模型的建立及其颈淋巴结转移[J]. *口腔医学纵横杂志*, 2000, 16(1): 10-12.

[11] Feng L, Wang Z. Chemopreventive effect of celecoxib in oral precancers and cancers[J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(10): 1842-1845.

[12] 聂敏海, 钟利, 曾光明. 细胞角蛋白 CK19 在口腔黏膜癌变过程中的变化[J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(3): 187-191.

[13] Takeuchi S, Nakanishi H, Yoshida K, et al. Isolation of differentiated squamous and undifferentiated spindle carcinoma cell lines with differing metastatic potential from a 4-nitroquinoline N-Oxide-induced tongue carcinoma in a F344 rat[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(12): 1211-1221.

[14] 李金荣, 何荣根. 口腔颌面部肿瘤基础研究新进展[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 98.

(收稿日期: 2013-01-21 修回日期: 2013-04-12)