

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.003

当归红芪超滤物对顺铂诱导大鼠肾足细胞损伤的保护作用研究*

李竺娟¹, 寇 炜^{1△}, 朱琳菊¹, 孙少伯², 马桂兰¹

(1. 西北民族大学医学院, 兰州 730030; 2. 甘肃中医药大学中西医结合系, 兰州 730000)

[摘要] **目的** 探究当归红芪超滤物(RAS-RH)对顺铂体外诱导大鼠肾足细胞损伤的保护作用。**方法** 本实验选取大鼠肾足细胞分为对照组、药物组、顺铂组及联合组,采用倒置相差显微镜观察顺铂对大鼠肾足细胞生长的影响,利用实时细胞分析技术监测给予 RAS-RH 前、后细胞的生长指数(CI),流式细胞仪检测大鼠肾足细胞的凋亡率。**结果** 顺铂对大鼠肾足细胞生长增殖具有明显抑制作用,联合组对顺铂诱导的大鼠肾足细胞损伤具显著的保护作用;流式细胞仪显示,联合组大鼠肾足细胞凋亡率明显低于顺铂组凋亡率($P < 0.05$)。**结论** RAS-RH 对顺铂诱导的体外大鼠肾足细胞损伤具有明显的保护作用。

[关键词] 当归红芪超滤物;大鼠肾足细胞;顺铂;凋亡**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0191-03

Protective effects of Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari on the injury of rat kidney podocytes induced by cisplatin in vitro*

LI Zhujuan¹, KOU Wei^{1△}, ZHU Linju¹, SUN Shaobo², MA Guilan¹

(1. Department of Medicine, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu 730030, China;

2. Department of Integrated of Chinese and Western Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari (RAS-RH) on rat kidney podocytes injury induced by cisplatin in vitro. **Methods** Rat kidney podocytes were divided into the control group, the drug group, the cisplatin group and the combination group. Cisplatin influence on rat kidney podocytes was observed by inverted phase contrast microscope. Cell growth index (CI) before and after RAS-RH was observed by real-time cell analysis, and the apoptosis rate was measured by flow cytometry. **Results** Cisplatin significantly inhibited the growth and proliferation of rat kidney podocytes. And the combination group showed significant protective effects on cisplatin-induced kidney podocytes injury. Flow cytometry showed that the apoptosis rate of kidney podocytes in the combination group was significantly lower than that in the cisplatin group ($P < 0.05$). **Conclusion** RAS-RH had obvious protective effects on cisplatin-induced kidney podocytes injury in vitro.

[Key words] RAS-RH; rat renal podocyte; cisplatin; apoptosis

作为常规化疗药物的顺铂在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常细胞及免疫系统也会产生不良反应,其中肾毒性为其主要的不良反应^[1]。许多研究证实一些中药成分发挥着提高机体免疫、保护细胞的作用,因此,推测当归、红芪等中药材某些成分可能对机体细胞起到一定保护作用。在肿瘤化疗过程中辅以当归红芪超滤物(RAS-RH)以达到对化疗药物产生减毒的效果,以保护正常细胞。本实验借助大鼠肾足细胞,采用顺铂常规化疗,辅以超滤技术提取纯化的

RAS-RH 干预,阐明 RAS-RH 通过调控肾足细胞凋亡的作用减轻肾毒性,为当归、红芪抗肿瘤的临床应用提供一定的实验依据,现报道如下。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 细胞 大鼠肾足细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所,经甘肃中医药大学中西医结合实验室传代培养。

1.1.2 药物 中药红芪、当归均采自甘肃省岷县,经

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460677);西北民族大学 2017 年本科生科研创新项目资助(Y17051)。 作者简介:李竺娟(1995—),在读本科,主要从事肿瘤基础研究。 △ 通信作者, E-mail: yxkw@xbmu.edu.cn。

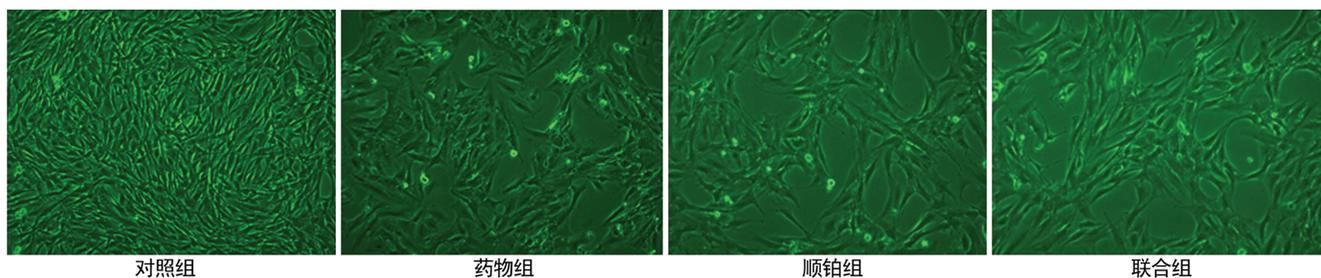


图 1 倒置相差显微镜观察不同分组肾足细胞的生长的代表图

甘肃中医药大学药学院生药学教研室鉴定;红芪是豆科岩黄蓍属植物多序黄芪的干燥根茎,当归为伞形科植物的干燥根,RAS-RH 参照本研究小组前期制作流程和结果,由甘肃中医药大学科研实验中心与甘肃省膜科学研究院联合制备。

1.1.3 试剂及仪器 倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS);Thermo 311 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);电动离心机(金坛市恒丰仪器厂);SCS-24 摇床(上海市离心机械研究所);精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);高糖培养基、0.5%胰蛋白酶、TrizolX-100、胎牛血清、100×青霉素-链霉素溶液均为美国 HyClone 公司产品;超净工作台、流式细胞仪、E-Plate 16 孔细胞检测板、xCELLigence RTCA 实时细胞功能分析仪(艾森生物-杭州有限公司);顺铂(6J014A89)上海谱振生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RAS-RH 的制备 当归、红芪饮片以 1:5 的比例混合,水煎煮两次,过滤水煎液并加热浓缩后,陶瓷膜微滤浓缩液(技术参数为压力 0.2 mPa/m³、温度 25℃,流量 10 L·h⁻¹·m⁻²),选用截留相对分子量为 1×10⁵ PNA 中空纤维超滤膜,超滤经微滤处理后的当归、红芪水煎剂浓缩液(技术参数:压力 5~6 kg/m³、温度 25℃,流量 10 L·h⁻¹·m⁻²),将超滤液喷雾干燥成粉,相对生药材的得率为 0.9%^[2]。

1.2.2 细胞分组及处理 将大鼠肾足细胞分成 4 组:对照组、药物组、顺铂组及联合组。顺铂组一次性给予顺铂 4 μg/mL 处理 24 h,药物组给予 RAS-RH 10 μg/mL 培养 24 h,联合组先给予 RAS-RH 10 μg/mL 培养 24 h,再一次性给予顺铂 4 μg/mL 处理。

1.2.3 RTCA 实时细胞分析 检测板前 4 孔加入 150 μL 高糖培养基,后 4 孔加入 150 μL RAS-RH,放入 RTCA Station 中测定基线,保证每孔接触正常并且细胞指数在正常值之内。取制备好的大鼠肾足细胞悬液,分别以每孔 4×10³ 个接种于检测板 E-Plate 16 中,在超净台中静置 30 min 后,置于培养箱中的 RTCA 工作站中,每隔 15 min 记录细胞指数,总时长 96 h。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 0.25%胰酶消化收集各组细胞,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,在染色缓冲液中 5×10⁵ 个/mL 重悬细胞,吸取 100 μL 细胞(1×10⁵)至试管中,加入 5 μL 荧光标记的膜联蛋白 V(Annexin V)试剂和 3 μL 碘化丙啶(PI),混匀后避光室温孵育 15 min,孵育后加入 400 μL 染色缓冲液,流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对大鼠肾足细胞增殖的抑制作用 顺铂组肾足细胞经过顺铂 4 μg/mL 处理 24 h 后,细胞增殖受到明显抑制,联合组肾足细胞的生长要明显好于顺铂组,见图 1。RTCA 分析显示,顺铂对肾足细胞具有较强的生长抑制作用,其抑制程度在一定时间(72 h)随着作用时间增加而增强,联合组肾足细胞的生长要好于顺铂组($P < 0.05$),顺铂处理肾足细胞的半数致死浓度(IC₅₀)值为 5.30 μg/mL,24 h 后达到最大抑制率,见图 2。

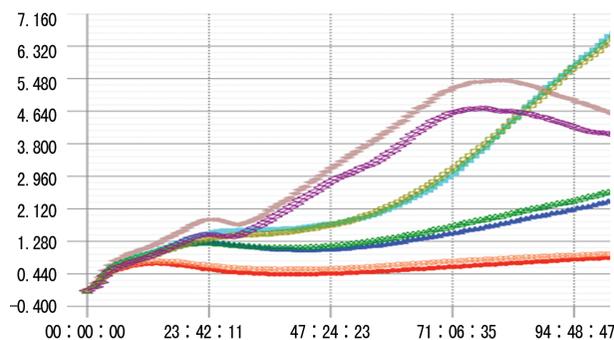


图 2 利用 RTCA 实时分析不同分组肾足细胞的生长

2.2 流式细胞仪检测 RAS-RH 对肾足细胞凋亡的影响 细胞凋亡实验结果显示:药物组[(6.24±0.35)%]与对照组[(2.68±0.11)%]的凋亡率比较差异无统计学意义($P = 0.093$)。顺铂组[(25.80±2.94)%]与对照组[(2.68±0.11)%]、药物组[(6.24±0.35)%]、联合组[(10.98±1.84)%]的凋亡率两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

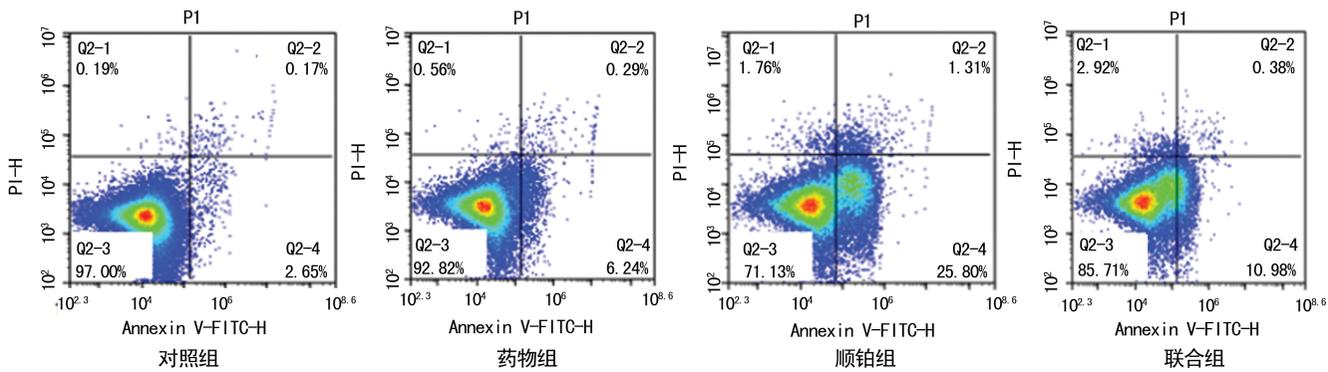


图 3 流式细胞仪检测不同分组凋亡率的代表图

3 讨论

《中国药典》载当归为伞形科植物的干燥根，具有“补血、活血、调经止痛”等功效^[3]。研究表明，当归所含的生物活性物质主要是挥发性与非挥发性化学物质，而产生效应的主要有挥发油、藁苯内酯、阿魏酸、多糖等成分^[4]。红芪为豆科岩黄芪属植物，《中国药典》收录的常用中药红芪为多序岩黄芪的根，红芪入药史载于南北朝梁·陶弘景著的《本草经集注》，具有“扶正祛邪，益气固本”的功效^[3]。红芪含有多糖、生物碱、黄酮、氨基酸等物质，且多糖为红芪中最主要的活性成分，是一种杂多糖，具有抗氧化、抗癌、提高机体免疫力等作用^[5]。寇宁等^[6]研究表明，红芪多糖具有较强的清除羟自由基、超氧阴离子自由基及 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基等作用。近年来一些研究证明，RAS-RH 中，红芪补血，当归养血，两药合用共奏补气生血之功，使血气旺盛，肾精髓海充足^[7]。研究发现，红芪多糖能明显抑制多种肿瘤细胞增殖，可通过增强机体免疫能力抗癌，还能在体外致使肿瘤细胞周期停滞、诱导部分肿瘤细胞凋亡、对化疗药物起减毒增敏效果等^[8]。王小军等^[9]利用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法和流式细胞术研究发现，红芪多糖-1 可促进人肺腺癌 A549 细胞活性氧自由基 (ROS)、丙二醛 (MDA) 的上调，同时促进谷胱甘肽 (GSH)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、总抗氧化能力 (T-AOC) 的下调，不同剂量红芪多糖-1 均具有抗肿瘤活性的作用，提示其抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖、诱导凋亡可能与调控细胞内氧化/抗氧化机制平衡有关。刘华等^[10]通过流式细胞仪及 RT-PCR 法研究红芪多糖诱导肺腺癌细胞凋亡与 Bax/Bcl-2 表达，观察发现不同浓度的红芪多糖均可诱导 A549 细胞凋亡，均可降低 Bcl-2 蛋白的表达，相应提高 Bax 蛋白的表达，且呈浓度依赖性，其机制可能是通过调节细胞内 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达而诱导 A549 细胞的凋亡。张艳霞等^[11]采用 MTT 比色法检测当归挥发油对 SPC-A-1 细胞的细胞毒作用；流式细胞术检测 SPC-

A-1 细胞凋亡及周期；吖啶橙/溴化乙锭 (AO/BE) 双荧光染色法观察 SPC-A-1 细胞凋亡，研究发现当归挥发油可诱导 SPC-A-1 细胞凋亡，推断出当归挥发油可能通过阻滞细胞于 G₂ 期，从而起到抑制 SPC-A-1 细胞增殖的作用。安静等^[12]实验采用 AOM/DSS 诱导小鼠炎症相关结直肠癌模型，探究当归多糖、当归油对肿瘤的预防作用，结果表明此两种当归提取物单独使用时均具有降低肿瘤发病率及抑制肿瘤发展的作用，且两者具有协同作用，以当归油与高剂量的当归多糖配伍对结直肠癌的发生、发展抑制作用最强。

顺铂作为主要抗肿瘤药物，在临床上被广泛利用，但其在杀死肿瘤细胞的同时亦损伤正常细胞，且伴有严重的肾毒性^[13]，成为顺铂化疗在临床上应用的瓶颈。肾小球足细胞的滤过功能是肾脏生理功能的基础，足细胞病变是导致慢性肾小球肾炎滤过功能损伤的决定因素^[14]。顺铂可导致 DNA 物理结构的损伤，而这些损伤能被细胞内的损伤识别蛋白所识别，从而启动包括蛋白激酶、c-abl 和 p53 在内的信号转导途径，这些途径一经启动都可诱导细胞凋亡^[15]。

本研究采用倒置相差显微镜和 RTCA 实时细胞分析观察发现顺铂对大鼠肾足细胞的增殖具有明显的抑制作用，而 RAS-RH 可以对顺铂导致的细胞损伤具有一定的保护作用；同时 RTCA 观察细胞增殖抑制的动态改变，流式细胞仪检测顺铂组 [(25.80 ± 2.94)%] 的凋亡率要明显高于对照组 [(2.68 ± 0.11)%]、药物组 [(6.24 ± 0.35)%]、联合组 [(10.98 ± 1.84)%]，差异均有统计学意义 (P < 0.05)，说明 RAS-RH 可以降低顺铂诱导的凋亡率。

综上所述，RAS-RH 对顺铂诱导的大鼠肾足细胞损伤作用具有一定的保护作用，其作用机制可能是 RAS-RH 通过下调大鼠肾足细胞的凋亡率而实现，但 RAS-RH 如何具体影响凋亡细胞的分子机制仍有待进一步研究。

参考文献

[1] 张静, 周文. 顺铂肾毒性相关机制及其防 (下转第 197 页)

- 228-233.
- [2] 房俊. 口腔过敏综合征的诊治[J]. 中国临床医生, 2014, 43(12):11-12.
- [3] LUDMAN S, JAFARI-MAMAGHANI M, EBLING R, et al. Pollen food syndrome amongst children with seasonal allergic rhinitis attending allergy clinic[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2016, 27(2):134-140.
- [4] KIM J H, KIM S H, PARK H W, et al. Oral allergy syndrome in birch pollen-sensitized patients from a Korean university hospital[J]. *J Korean Med Sci*, 2018, 33(33):e218.
- [5] KASHYAP R R, KASHYAP R S. Oral allergy syndrome: an update for stomatologists[J]. *J Allergy (Cairo)*, 2015, 2015:543928.
- [6] ERIKSSON N E, FORMGREN H, SVENONIUS E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy[J]. *Allergy*, 1982, 37(6):437-443.
- [7] CAIMMI D, RASCHETTI R, PONS P, et al. Epidemiology of cypress pollen allergy in montpellier[J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2012, 22(4):280-285.
- [8] WESTMAN M, STJÄRNE P, ASARNOJ A, et al. Natural course and comorbidities of allergic and nonallergic rhinitis in children[J]. *J Allergy Clin Immunol.*, 2012, 129(2):403-408.
- [9] CALISKANER Z, NAIBOGLU B, KUTLU A, et al. Risk factors for oral allergy syndrome in patients with seasonal allergic rhinitis[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2011, 16(3):e312-316.
- [10] SPRINGSTON E E, SMITH B, SHULRUFF J A, et al. Variations in quality of life among caregivers of food allergic children[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2010, 105(4):287-294.
- [11] TARIQ S M, MATTHEWS S M, HAKIM E A, et al. Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2000, 11(3):162-167.
- [12] ROBERTS G, PATEL N, LEVI-SCHAFFER F, et al. Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(1):168-174.
- [13] MA S, SICHERER S H, SAMPSON H A, et al. A survey on the management of oral allergy syndrome (OAS) in allergy practices[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(4):784-788.
- [14] HAO G, ZHENG Y, WANG Z, et al. High correlation of specific IgE sensitization between birch pollen, soy and apple allergens indicates pollen-food allergy syndrome among birch pollen allergic patients in northern China[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(5):399-404.
- [15] KONDO Y, URISU A. Oral allergy syndrome[J]. *Allergol Int*, 2009, 58(4):485-491.

(收稿日期:2018-01-18 修回日期:2018-09-01)

(上接第 193 页)

- 护研究现状[J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(22):1785-1789.
- [2] 樊秦, 李应东, 舒畅, 等. 超滤膜分离纯化当归补血汤的研究[J]. *中成药*, 2010, 32(8):1438-1440.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:124-142.
- [4] 王英, 张尚智, 朱田田, 等. 当归有效成分的提取与分析研究进展[J]. *中兽医医药杂志*, 2016, 35(2):75-79.
- [5] 柳小亚, 李继平, 陈心悦, 等. HPLC 同时测定红芪中 8 个活性成分的含量及聚类分析[J]. *药学报*, 2016, 51(5):786-791.
- [6] 寇宁, 李磊强, 李钦, 等. 不同提取方法对红芪多糖体外抗氧化活性的影响研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(15):100-103.
- [7] 朱贝贝, 刘斌, 李淑玲, 等. 当归红芪超滤膜提取物对过氧化氢致 PC12 细胞氧化损伤的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2016, 11(9):1228-1232.
- [8] 赵昱波, 陈俊, 许凌, 等. 红芪的化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(22):3434-3440.
- [9] 王小军, 刘华. 红芪多糖-1 对人肺腺癌 A549 细胞氧化应激的影响[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2017, 16(2):127-131.
- [10] 刘华, 闫立萍, 王小军. 红芪多糖诱导肺腺癌细胞凋亡与 Bax/Bcl-2 表达的研究[J]. *西北国防医学杂志*, 2016, 37(4):211-213.
- [11] 张艳霞, 张延英, 张正顺, 等. 当归挥发油对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(6):102-105.
- [12] 安静, 赵博琛, 吴清, 等. 当归提取物配伍应用对小鼠结肠癌的预防作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(5):309-313.
- [13] 钱超, 陆清鸣, 张晓春. 癌症患者顺铂化疗相关肾毒性的临床进展[J]. *实用癌症杂志*, 2014, 29(5):607-609.
- [14] ASANUMA K, MUNDEL P. The role of podocytes in glomerular pathobiology[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2013, 7(4):255-259.
- [15] 酆豪, 陶伟, 姚日生. 抗肿瘤药物顺铂及其纳米载体的研究进展[J]. *安徽化工*, 2013, 39(5):5-9.

(收稿日期:2018-07-20 修回日期:2018-09-03)