

黄芪甲苷纳米混悬剂对肾小球系膜细胞炎症反应影响的研究

施海涛¹ 李锋林² 王学军³

(1 黑龙江省中医药科学院 博士后 大庆龙南医院肾内科 2. 大庆龙南医院药剂科 3 通讯作者:黑龙江省中医药科学院)

摘要: 目的: 通过观察黄芪甲苷纳米混悬剂 (AS-IV-NPs) 体外实验对肾小球系膜细胞 (HMC) 糖尿病肾病 (DN) 模型炎症反应的影响, 探讨中药黄芪有效成分在糖尿病肾病模型中作用机制, 为未来临床治疗提供实验依据。方法: 1. 制备黄芪甲苷纳米混悬剂。2. 细胞培养建立肾小球系膜细胞糖尿病肾病模型。3. MTT 法探索出黄芪甲苷纳米混悬剂抑制肾小球系膜细胞炎症的最佳浓度。4. 活性氧(ROS)实验。结果: 采用 MTT 法在于考察黄芪甲苷 (AS-IV) 经过纳米化后增强对细胞生长的抑制作用, 并筛选对于 HMC 的最佳给药浓度剂量为 320 $\mu\text{g/ml}$ 是最佳浓度。黄芪甲苷纳米混悬剂具有极小的体积以及与组织黏膜良好的相容性, 可以明显消除 DN 模型细胞产生的 ROS。结论: 黄芪甲苷纳米混悬剂对肾小球系膜细胞糖尿病肾病模型炎症反应的最佳药物浓度是 320 $\mu\text{g/ml}$, 模型细胞中的 ROS 被消除可能是治疗糖尿病肾病的关键机制之一。

关键词: 黄芪甲苷纳米混悬剂; 肾小球系膜细胞; 糖尿病肾病; 炎症;

黄芪^[1]为豆科草本植物蒙古黄芪、膜荚黄芪的根, 是一种传统的中药材, 多年生草本植物, 具有补气、消肿、排毒、调节血糖作用。现代研究表明, 黄芪含有多种化合物成分, 包括多糖、氨基酸等以及多种稀有金属元素, 其中黄芪多糖^[2]是黄芪的主要有效成分。黄芪多糖中的主要有效成份是多糖类和黄芪苷类。AS-IV 为黄芪苷的第 IV 类^[3]。深入研究 AS-IV 发现, 该药物还有一些特殊的药理作用, 包括肾保护^[4]、抗炎及增强免疫力^[5]、抗肿瘤^[6]、治疗 DN 等, 而且药效显著。

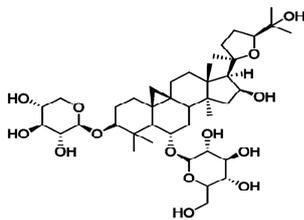


图 1-1 黄芪甲苷分子结构

Fig. 1-1 The molecular structure AS-IV

炎症反应是机体内致炎细胞因子与抗炎细胞因子比例失衡导致的, 在有炎症产生时致炎细胞因子表达升高。研究探索发现 AS-IV 具有抗炎作用, 因为 AS-IV 具有类似 COX-1 分子结构, 该分子作用于炎症组织可以释放并消除炎症因子, 因此对炎症反应都有一定的减轻作用, 对于糖尿病 (DM) 的作用最为明显。在其作用时还可以影响一些细胞因子和蛋白因子的表达, 例如 TNF- α 、IL-6 等因子和 MCP-1、ICAM-1、NF- κ B 等蛋白。随着研究的深入, 发现 AS-IV 还可促进多种免疫共刺激因子的表达, 提高细胞免疫功能, 可望成为一种抗炎剂使用。本研究通过观察黄芪甲苷纳米混悬剂体外实验对肾小球系膜细胞糖尿病肾病模型炎症反应的影响, 探讨中药黄芪有效成分在糖尿病肾病模型中作用机制, 为治疗提供实验依据。

一、实验材料与方法:

试剂配制:

1. PBS 缓冲液: 精准称取 NaCl 8.0g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.63g、KH₂PO₄ 0.24g 溶解在 1000ml 蒸馏水中, 调节 pH 在 7.2~7.4, 高压灭菌。

2. 胰酶: 精密称取胰酶粉末 0.25g, PBS 溶解并定容 100ml, 并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤 2 次, eppendorf 管封口, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3. MTT 溶液: 精密称取 MTT 0.5g, 在超声条件下溶解在 100ml PBS 中, 并利用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

二、实验步骤:

1. 首先制备黄芪甲苷纳米混悬剂, 运用黄芪甲苷 0.4g 泊洛沙姆 0.5g 溶于 100ml 的超纯水中高速均质机 5 次每次 20s (设置参数: A) 高压均质机 15 个循环 (压力: 450pa)。

2. 肾小球系膜细胞糖尿病肾病造模:

采用高糖培养 24h 以上的 HMC 作为 DN 细胞模型。从条件为

5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱中取出处于对数生长期的 HMC, 弃去培养液, 用提前温浴过的 PBS 洗涤细胞三次, 加入 1ml 胰酶消化, 显微镜下观察, 直至一半以上的细胞从细胞瓶底壁脱落, 立刻加入 4ml 含 10% 胎牛血清 RPMI 培养液终止消化, 用弯头滴管吹打细胞瓶壁使之转变为细胞悬液, 把细胞悬液转移至离心管中进行离心, 离心条件为 2000rpm/min, 3min, 移弃上清液并重悬细胞, 转移到新的培养瓶中, 最后加入适量含 10% 胎牛血清 RPMI 培养液, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养。

取处于对数生长期的 HMC, 在超净工作台内弃去旧的培养液, 每次用 3ml PBS 仔细漂洗 3 次, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 至细胞培养箱中孵育 24h 以上。使用 ROS 检测试剂盒检测 HMC 细胞内 ROS 数量变化, 如果细胞内 ROS 明显增多, 表示糖尿病肾病细胞模型建立成功。

3. 本实验的体外评价涉包括使用 MTT 比色法检测 AS-IV-NPs 对 HMC 的生存活力的影响, 该方法经济且灵敏度高, 采用 MTT 法在于考察 AS-IV 经过纳米化后是否降低增强对细胞的毒性与增强对细胞生长的抑制作用, 重点在于筛选对于 HMC 的最佳给药浓度;

单细胞悬液接种于 96 孔培养板 (DMEM 培养) (每次平行 3 组); 103~104 细胞/孔, 每孔培养基总量 200 微升 (96 孔培养板每孔容积 370 微升), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24h。换 SNNC-AS-IV+培养液 (DMEM), 浓度可变 (随实验设计), 总量 200 微升。培养 24h。加入 2 毫克/毫升的 MTT 液 (100 微升/孔); 继续培养 4 小时。吸出孔内培养液后, 加入 DMSO 液 (100 微升/孔), 将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 分钟, 使结晶物溶解。酶标仪检测各孔 OD 值 (检测波长 490nm)。记录结果, 绘制。 实验设计浓度:

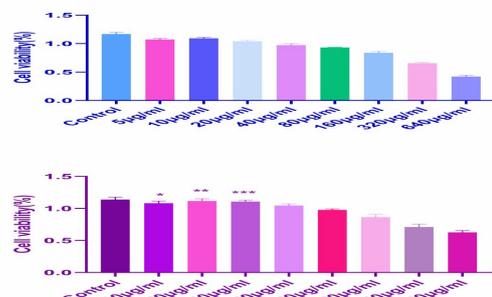
实验 1: 5、10、20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g/ml}$

实验 2: 10、20、40、80、160、320、640、1280 $\mu\text{g/ml}$

三、统计学方法: 所有收集数据应用 SPSS20.0 统计软件进行统计学分析, 各项数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

四、实验结果:

1. MTT 比色法检测 AS-IV-NPs 对 HMC 的生存活力的影响及给药浓度



2.活性氧试剂实验



SPSS 数据分析：方差齐性检验分析 P 0.168 > 0.05 各别组之间存在差异（多重比较）

单因素方差分析 P 0.046 < 0.05 差异具有统计学意义

五、讨论

机体在正常运作时始终处于动态平衡，当机体受到不良刺激时就会做出防御，氧化应激就是在正常防御系统处理不完时产生的反应，同时会释放活性氧(ROS)和活性氮(Recurrent nephrotic syndrome, RNS)，但是剩余大量的ROS和RNS会引起组织损伤。例如心脏病^[12]、DM等就是氧化应激引起的。作为清除ROS和RNS的抗氧化酶系统(SOD、GSH-Px、CAT)可保护细胞不受氧化应激损伤，及时清理ROS和RNS。研究表明AS-IV可以通过提高抗氧化酶的表达减少ROS和RNS，发挥其抗氧化作用，但是AS-IV并不是抗氧化剂。

从AS-IV-NPs对HMC的生存抑制率的比较中发现，

AS-IV-NPs具有良好的抑制HMC生长的作用。通过半数有效量(IC50)值计算可知，对于HMC而言，给予游离AS-IV后，其IC50值为14.621 μg/ml，给予AS-IV-NPs后，其IC50值为9.727 μg/ml。因此，我们可以认为纳米级的AS-IV抗炎效果通过计算发现，这种对HMC的抑制作用增强了50.3%。采用MTT法在于考察AS-IV经过纳米化后增强对细胞生长的抑制作用，并筛选对于HMC的最佳给药浓度剂量为320 μg/ml是最佳浓度。黄芪甲苷纳米混悬剂具有极小的体积以及与组织黏膜良好的相容性，可以明显消除DN模型细胞产生的ROS。模型细胞中的ROS被消除可能是治疗糖尿病肾病的关键机制之一。

基金项目：黑龙江省博士后管理办公室资助项目编号：LBH-Z18271

参考文献：

[1]吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(003):232-234.
 [2]ZHANG Z, ZHANG L, XU H. Effect of Astragalus polysaccharide in treatment of diabetes mellitus: a narrative review[J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39(1):133-138.
 [3]杨俊, 王文辉, 王齐, 等. Determination of Astragaloside IV in Radix Astragali by UPLC-ELSD%UPLC-ELSD法测定黄芪中的黄芪甲苷含量[J]. 光谱实验室, 2009, 026(003):484-486.
 [4]SONG Y, HU T, GAO H, et al. Altered metabolic profiles and biomarkers associated with astragaloside IV-mediated protection against cisplatin-induced acute kidney injury in rats: An HPLC-TOF/MS-based untargeted metabolomics study[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 183:114299.
 [5]姚余有, 江礼生, 陈敏珠. 黄芪总黄酮对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用及机理研究[J]. 中成药, 2001, 023(009):661-663.