

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.44.014 [http://www.crter.org]

郭禹, 李岩, 房卉, 印晓星, 魏群利. 大黄酸及大黄素诱导高糖大鼠肾小球系膜细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(44):7739-7744.

## 大黄酸及大黄素诱导高糖大鼠肾小球系膜细胞的凋亡\*\*\*\*

郭禹, 李岩, 房卉, 印晓星, 魏群利(徐州医学院药学院, 江苏省徐州市 221000)

### 文章亮点:

1 在前期中药复方消可宁药用实验基础上, 分别用不同浓度 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  的大黄酸和大黄素刺激高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞, 比较大黄酸与大黄素对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响程度。

2 由中药小复方为基础入手, 探讨小复方中君药大黄中大黄酸、大黄素对糖尿病肾病相关作用机制, 符合中药发展思路的潮流, 实验结果证明了低中高浓度的大黄酸、大黄素均可诱导肾小球系膜细胞凋亡, 但大黄酸的药效强于大黄素。

### 关键词:

器官移植; 器官移植基础实验; 大黄酸; 大黄素; 糖尿病肾病; 肾小球系膜细胞; 细胞凋亡; 肾功能; 高糖; 细胞核; 凋亡率; 省级基金

### 主题词:

器官移植; 肾移植; 肾小球; 糖尿病肾病; 细胞凋亡

### 基金资助:

中国博士后科学基金(2003034391)\*; 南京军区十一五医药卫生科研项目(08MA098)\*; 江苏省博士后科学基金(0901065C)\*; 徐州医学院院长专项人才基金(09kjz23)\*

### 摘要

**背景:** 课题组前期实验证实中药复方消可宁能有效防治早期糖尿病肾病。

**目的:** 比较大黄酸与大黄素对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响程度。

**方法:** 分别用不同浓度 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  的大黄酸和大黄素刺激高糖培养的肾小球系膜细胞, 苏木精-伊红染色观察凋亡细胞形态, DAPI 荧光染色观察细胞核凋亡情况, 流式细胞仪观察细胞凋亡率。

**结果与结论:** 苏木精-伊红染色及 DAPI 染色结果显示大黄酸对高糖培养的肾小球系膜细胞凋亡的影响程度强于大黄素的影响程度。细胞凋亡率的对比显示大黄酸对高糖培养的肾小球系膜细胞的早期凋亡率与晚期凋亡率均强于大黄素。说明低中高浓度的大黄酸、大黄素均可诱导肾小球系膜细胞凋亡, 但大黄酸的药效强于大黄素。

## Rhein and archen induce the apoptosis of mesangial cells in high glucose rats

Guo Yu, Li Yan, Fang Hui, Yin Xiao-xing, Wei Qun-li (School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Our previous study has already manifested that Chinese medicine *Xiaokening* can effectively prevent and treat the early diabetic nephropathy.

**OBJECTIVE:** To compare the effect of rhein and archen on the apoptosis of mesangial cells of rats cultured with high glucose.

**METHODS:** Mesangial cells were stimulated by different concentrations of rhein and archen (20, 40 and 80  $\mu\text{mol/L}$ ). Morphology of apoptotic cells was observed by hematoxylin-eosin staining. Karyon apoptosis was examined by fluorescence staining of DAPI. Cell apoptosis rate was detected by flow cytometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The outcome of hematoxylin-eosin staining and DAPI staining indicated that the effect of rhein was much stronger than that of archen on the apoptosis of mesangial cells in the rats cultured with high glucose. Comparison of the apoptosis rate also indicated that the rhein had a stronger effect on the earlier and the later stage apoptotic rate of mesangial cells than archen. Both rhein and archen with different concentrations can induce apoptosis of mesangial cells, but the effect of rhein is much stronger.

**Subject headings:** organ transplantation; kidney transplantation; kidney glomerulus; diabetic nephropathies; apoptosis

**Funding:** China Postdoctoral Science Foundation, No. 2003034391\*; Medical and Health Research Projects of "Eleventh Five-year Planning" of Nanjing Military Region, No. 08MA098\*; Jiangsu Province Postdoctoral Science Foundation, No. 0901065C\*; Special Foundation of President of Xuzhou Medical College, No. 09kjz23\*

Guo Y, Li Y, Fang H, Yin XX, Wei QL. Rhein and archen induce the apoptosis of mesangial cells in high glucose rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(44):7739-7744.

郭禹★, 女, 1987年生, 江苏省徐州市人, 汉族, 2012年徐州医学院毕业, 硕士, 主要从事中药药理研究。  
guoyu19861230@yahoo.com.cn

通讯作者: 魏群利, 博士, 教授, 主任医师, 徐州医学院药学院, 江苏省徐州市 221000  
22100015077860033@139.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)44-07739-06

收稿日期: 2013-01-05

修回日期: 2013-06-06

(20111214006/D·C)

Guo Yu★, Master, School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China  
guoyu19861230@yahoo.com.cn

Corresponding author: Wei Qun-li, Doctor, Professor, Chief physician, School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China  
15077860033@139.com

Received: 2013-01-05

Accepted: 2013-06-06

## 0 引言 Introduction

中药复方消可宁(制大黄、制附子、生黄芪)能有效防治早期糖尿病肾病并获得国家专利(专利号: 200410064899X)<sup>[1-4]</sup>, 实验证明其能够抑制高糖状态下肾小球系膜细胞过度增殖<sup>[5]</sup>。为进一步探讨其可能的有效组分, 实验将分步研究三味药的在组方中的作用及机制, 尤其是主药大黄主要活性成分的药理学作用。关于大黄酸、大黄素的报道甚多, 但大黄酸、大黄素对高糖状态下肾小球系膜凋亡的影响并未见报道, 也未见两者促凋亡的比较性研究。故实验选择大黄酸、大黄素两个活性成分进行研究。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照、开放性实验。

**时间及地点:** 实验于2011年7月在徐州医学院新药与临床应用重点实验室完成。

**材料:** SD大鼠肾小球系膜细胞株(HBZY-1)购于武汉博士德生物有限公司; 大黄酸标准品(批号201003)、大黄素标准品(批号201007)购于四川省维克奇生物科技有限公司; DMEM培养基(高糖)(批号1290007, 1240031)、胎牛血(批号8104931)购于美国Invitrogen GIBCO公司; DAPI染色液(批号C1005)、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号C0105)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(批号C1062)购于碧云天生物技术研究; FACS calibur流式细胞分析仪购于美国Becton Dickinson公司。

**实验方法:**

**大鼠肾小球系膜细胞的复苏及传代:** 取冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中肾小球系膜细胞细胞株, 于 $37^{\circ}\text{C}$ 水浴中迅速晃动, 水浴后离心, 离心半径12.5 cm, 1 000 r/min, 离心3 min, 弃上层冻存液, 加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM完全培养基移入细胞培养瓶于 $37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置培养。待细胞融合达80%以上后, 加入2 mL 0.25%胰蛋白酶消化液室温消化1 min, 弃去胰蛋白酶, 加2 mL DMEM完全培养基轻轻吹打使细胞完全脱壁, 制成细胞悬液, 进行传代培养。

**形态学观察细胞凋亡情况<sup>[6-8]</sup>:** 于6孔培养板中接种对数生长期细胞, 细胞密度 $1.0\times 10^5$ /孔。将细胞分为低糖组(5.56 mmol/L DMEM)、高糖组(25 mmol/L DMEM)、在高糖(25 mmol/L DMEM)基础上分别添加20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸和大黄素进行干预, 观察时间设置为24, 48 h。达到时间点时将6孔板置于倒置显微镜下观察细胞形态。用40 g/L多聚甲醛固定10 min, 进行苏木精-伊红染色, 按试剂盒说明书操作, 与显微镜下观察细胞形态并拍照。

**DAPI荧光染色观察细胞核凋亡情况<sup>[9-10]</sup>:** 取对数生长期细胞接种于6孔板中, 细胞密度 $1.0\times 10^5$ /孔。将细胞分为低糖组(5.56 mmol/L DMEM)、高糖组(25 mmol/L DMEM)、在高糖(25 mmol/L DMEM)基础上分别添加20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸和大黄素的干预组, 共8组进行实验, 观察时间设置为24, 48 h。到达时间点用40 g/L多聚甲醛固定10 min, 进行DAPI荧光染色, 按试剂盒说明书操作, 360 nm荧光显微镜下观察并拍照。

**流式细胞分析仪检测细胞凋亡率<sup>[11-13]</sup>:** 取对数生长期细胞制成悬液接种于新的细胞培养瓶中, 细胞密度 $5.0\times 10^6$ /瓶, 24 h后换用无血清DMEM培养基, 使细胞生长同步于 $G_0$ 期, 将细胞分为高糖对照组(25 mmol/L DMEM)、在高糖(25 mmol/L DMEM)基础上分别添加20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸和大黄素的干预组, 共7组进行实验, 观察时间设置为24, 48 h。到达时间点, 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 应用流式细胞仪进行检测, SPSS 16.0软件分析细胞凋亡率。

**主要观察指标:** ①不同浓度大黄酸、大黄素刺激后肾小球系膜细胞凋亡形态。②不同浓度大黄酸、大黄素刺激后肾小球系膜细胞细胞核凋亡形态的观察。③不同浓度大黄酸、大黄素对肾小球系膜细胞凋亡率的影响。

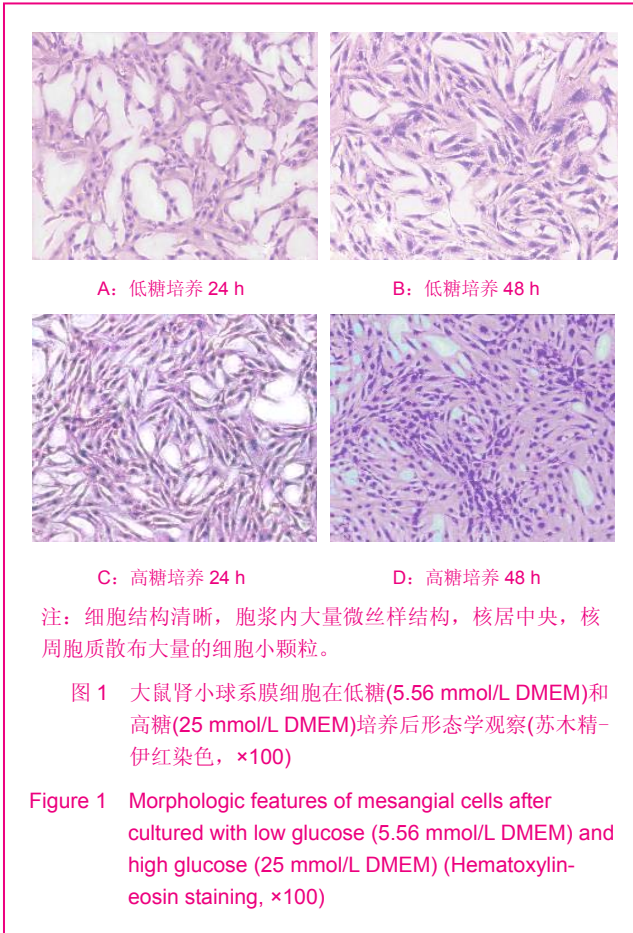
**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析, 实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多个样本均数的比较用方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 倒置相差显微镜观察** 24 h即可见细胞形态发生改变, 48 h细胞形态变化程度最明显, 且与浓度成正相关, 药物浓度越高细胞形态改变越明显。其中大黄酸各浓度组细胞形态变化程度强于大黄素各浓度组。倒置显微镜下观察可见大黄酸作用于大鼠肾小球系膜细胞, 20  $\mu\text{mol/L}$  24 h细胞聚集成团、收缩明显, 胞膜完整, 部分细胞脱壁悬浮, 生长不良; 48 h时细胞膜已不完整, 大部分细胞已脱壁悬浮。40  $\mu\text{mol/L}$  24 h细胞收缩较24 h明显, 细胞脱落数增加, 生长不良; 48 h视野内细胞数较24 h减少过半, 细胞聚缩成不规则团块。80  $\mu\text{mol/L}$  24 h细胞收缩较严重但胞膜完整, 大部分细胞悬浮, 生长不良; 48 h贴壁细胞数极少, 视野内细胞成零星状分布。

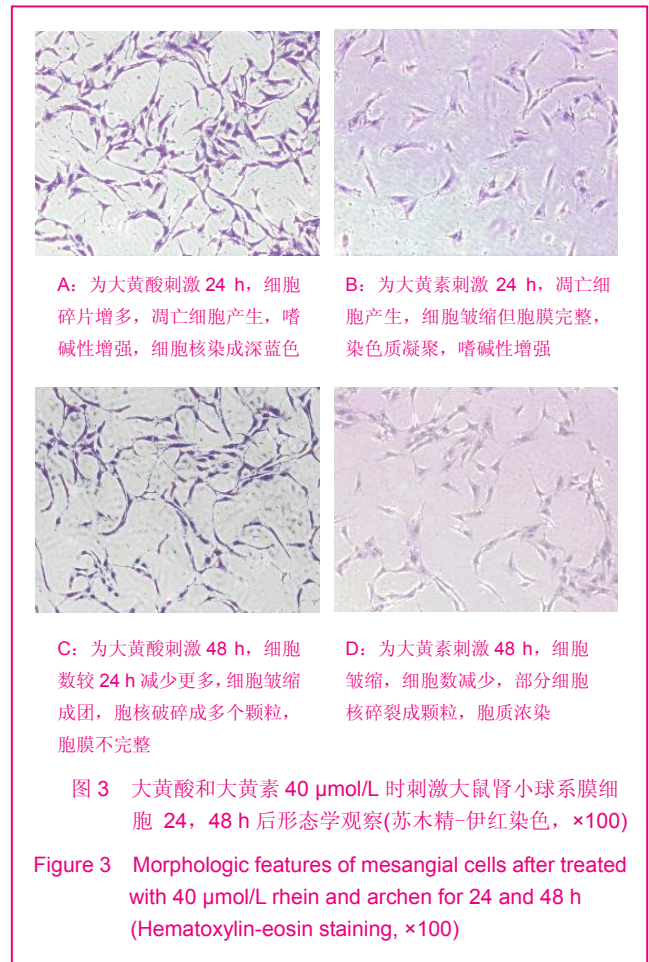
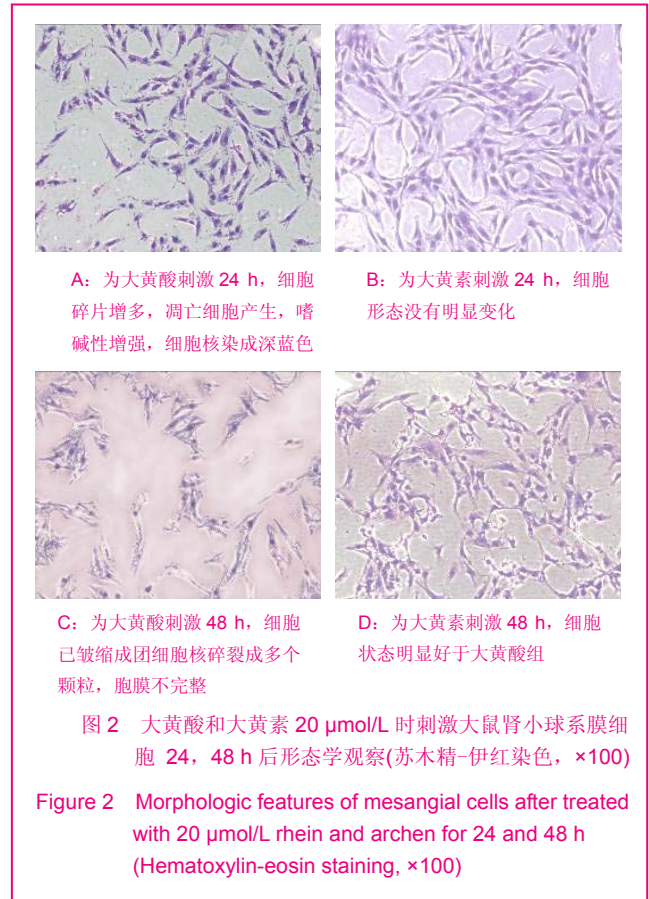
**2.2 苏木精-伊红染色结果** 低糖组、高糖组细胞结构清晰, 胞浆内大量微丝样结构, 核居中央, 多成圆形或椭圆形, 核周胞质散布大量的细胞小颗粒, 见图1。大黄酸作用于大鼠肾小球系膜细胞, 20  $\mu\text{mol/L}$ 组 24 h细胞碎片增多, 凋亡细胞产生, 细胞皱缩, 胞膜完整, 细胞核固化, 密度增大, 染色质凝聚, 嗜碱性增强, 细胞核染成深蓝色; 而大黄素20  $\mu\text{mol/L}$ 组24 h细胞形态没有

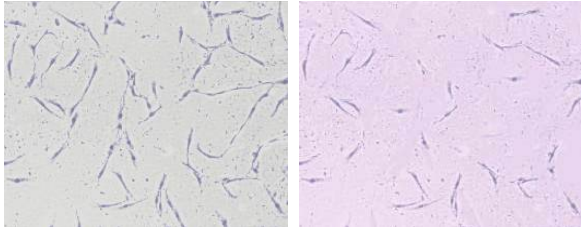
明显变化。大黄酸20  $\mu\text{mol/L}$  48 h时细胞已皱缩成团细胞核碎裂成多个颗粒, 胞膜不完整, 大黄素组明显好于大黄酸组, 见图2。



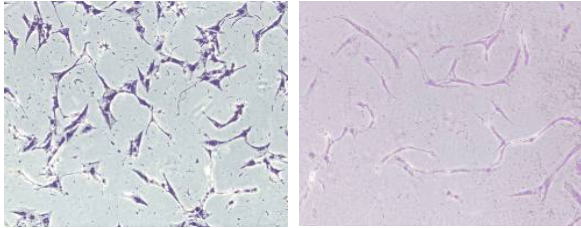
大黄酸40, 80  $\mu\text{mol/L}$ 作用于大鼠肾小球系膜细胞24 h, 细胞严重变形; 48 h时, 视野内细胞数较24 h减少更多, 细胞皱缩成团, 胞核破碎成多个颗粒, 胞膜不完整。大黄素40  $\mu\text{mol/L}$  24 h时凋亡细胞产生, 细胞皱缩但胞膜完整; 48 h时, 细胞皱缩, 细胞数减少, 部分细胞核碎裂成颗粒, 胞质浓染。80  $\mu\text{mol/L}$  24 h, 细胞皱缩成团, 细胞数减少, 碎裂成颗粒的细胞核增多; 48 h时视野内已找不到完整细胞核。见图3, 4。

**2.3 DAPI染色结果** 细胞核的形态改变是鉴别细胞凋亡的重要依据<sup>[14]</sup>。经DAPI染色后, 荧光显微镜下观察, 低糖和高糖组细胞细胞核分布均匀, 核较大, 细胞核和细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光细胞核, 见图5。20  $\mu\text{mol/L}$ 大黄酸作用于细胞24 h时部分细胞核染色质出现浓缩状态, 较大黄素细胞核变化明显; 48 h部分细胞核染色质高度凝聚, 核裂解为碎片, 而大黄素组细胞核只是大部分高度凝聚, 未见细胞碎片, 见图6。大黄酸40  $\mu\text{mol/L}$  24 h时细胞核裂解为碎片, 完整细胞核较少, 大黄素40  $\mu\text{mol/L}$  24 h时较大黄素组细胞核状态要好; 大黄酸40  $\mu\text{mol/L}$  48 h时完整细胞核较少, 大黄素相对较多, 见图7。





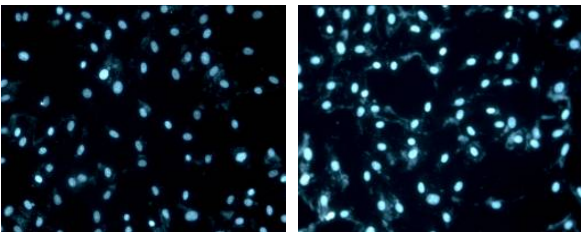
**A:** 为 大 黄 酸 刺 激 24 h, 细 胞 严 重 皱 缩 成 细 长 形, 贴 壁 细 胞 数 明 显 减 少, 染 成 深 蓝  
**B:** 为 大 黄 素 刺 激 24 h, 细 胞 皱 缩 成 团, 细 胞 数 减 少, 碎 裂 成 颗 粒 的 细 胞 核 增 多



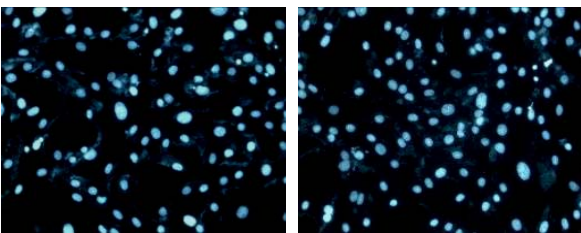
**C:** 为 大 黄 酸 刺 激 48 h, 比 40 μmol/L, 48 h 时 细 胞 减 少 更 多  
**D:** 为 大 黄 素 刺 激 48 h, 视 野 内 已 找 不 到 完 整 细 胞 核

**图 4** 大 黄 酸 和 大 黄 素 80 μmol/L 时 刺 激 大 鼠 肾 小 球 系 膜 细 胞 24, 48 h 后 形 态 学 观 察 (苏 木 精-伊 红 染 色, ×100)

**Figure 4** Morphologic features of mesangial cells after treated with 80 μmol/L rhein and archen for 24 and 48 h (Hematoxylin-eosin staining, ×100)



**A:** 低 糖 培 养 24 h  
**B:** 低 糖 培 养 48 h

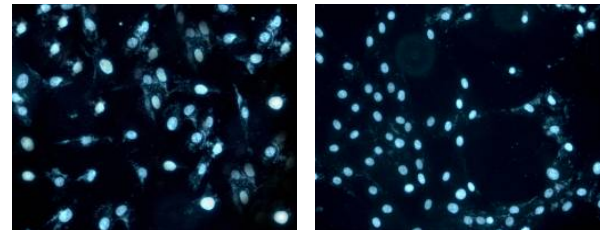


**C:** 高 糖 培 养 24 h  
**D:** 高 糖 培 养 48 h

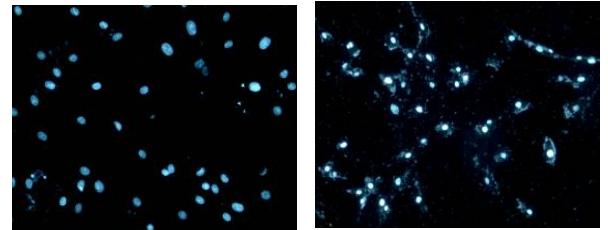
注: 细 胞 细 胞 核 分 布 均 匀, 核 较 大, 细 胞 核 和 细 胞 质 内 可 见 染 致 密 的 颗 粒 块 状 荧 光 细 胞 核

**图 5** 大 鼠 肾 小 球 系 膜 细 胞 在 低 糖 (5.56 mmol/L DMEM) 和 高 糖 (25 mmol/L DMEM) 培 养 后 DAPI 荧 光 染 色 观 察 (×200)

**Figure 5** DAPI fluorescence staining of mesangial cells after cultured with low glucose (5.56 mmol/L DMEM) and high glucose (25 mmol/L DMEM) (×200)



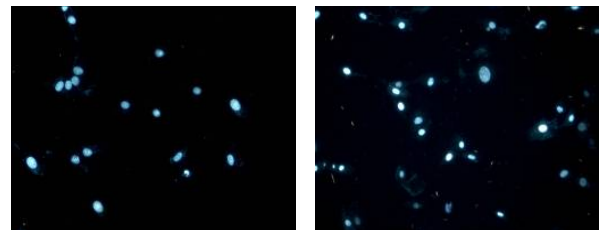
**A:** 为 大 黄 酸 刺 激 24 h, 部 分 细 胞 细 胞 核 染 色 质 出 现 浓 缩 状 态  
**B:** 为 大 黄 素 刺 激 24 h, 细 胞 浓 缩 状 态 不 如 大 黄 酸 刺 激 24 h 明 显



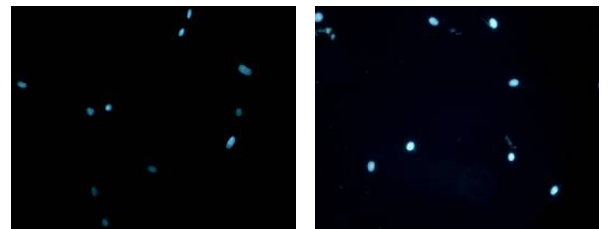
**C:** 为 大 黄 酸 刺 激 48 h, 部 分 细 胞 核 染 色 质 高 度 凝 聚, 部 分 细 胞 核 裂 解 为 碎 片  
**D:** 为 大 黄 素 刺 激 48 h, 细 胞 核 只 是 大 部 分 高 度 凝 聚, 未 见 细 胞 碎 片, 状 态 明 显 好 于 大 黄 酸 刺 激 48 h

**图 6** 大 黄 酸 和 大 黄 素 20 μmol/L 时 刺 激 大 鼠 肾 小 球 系 膜 细 胞 24, 48 h 后 DAPI 荧 光 染 色 观 察 (×200)

**Figure 6** DAPI fluorescence staining of mesangial cells after treated with 20 μmol/L rhein and archen for 24 and 48 h (×200)



**A:** 为 大 黄 酸 刺 激 24 h, 细 胞 核 裂 解 为 碎 片, 完 整 细 胞 核 较 少  
**B:** 为 大 黄 素 刺 激 24 h, 细 胞 核 染 色 质 高 度 凝 聚 边 缘 化, 完 整 细 胞 核 减 少, 但 较 大 黄 酸 刺 激 24 h 状 态 要 好



**C:** 为 大 黄 酸 刺 激 48 h, 完 整 细 胞 核 较 少  
**D:** 为 大 黄 素 刺 激 48 h, 完 整 细 胞 核 相 对 较 多

**图 7** 大 黄 酸 和 大 黄 素 40 μmol/L 时 刺 激 大 鼠 肾 小 球 系 膜 细 胞 24, 48 h 后 DAPI 荧 光 染 色 观 察 (×200)

**Figure 7** DAPI fluorescence staining of mesangial cells after treated with 40 μmol/L rhein and archen for 24 and 48 h (×200)

大黄酸80  $\mu\text{mol/L}$  24 h基本上没有完整细胞核存在, 48 h时视野内很难找到完整细胞核, 大黄素80  $\mu\text{mol/L}$  24 h时大部分细胞核裂解为碎片, 产生凋亡小体, 48 h时在镜下很难找到完整细胞核, 见图8。



图 8 大黄酸和大黄素 80  $\mu\text{mol/L}$  时刺激大鼠肾小球系膜细胞 24, 48 h 后 DAPI 荧光染色观察( $\times 200$ )

Figure 8 DAPI fluorescence staining of mesangial cells after treated with 80  $\mu\text{mol/L}$  rhein and archen for 24 and 48 h ( $\times 200$ )

2.4 流式细胞仪分析仪检测细胞凋亡率结果 细胞周期的紊乱与凋亡的诱导关系密切<sup>[6]</sup>。见表1, 2。

表 1 大黄酸, 大黄素 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  干预 24 h 后诱导 SD 大鼠肾小球系膜细胞的凋亡率

Table 1 Apoptotic rate of mesangial cells of Sprague-Dawley rats after treated with different concentrations (20, 40 and 80  $\mu\text{mol/L}$ ) of rhein and archen for 24 h ( $\bar{x}\pm s$ , %)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率和坏死细胞
高糖对照组	0.06 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.02
大黄酸 20 $\mu\text{mol/L}$	0.12 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.24 <sup>acd</sup>
大黄素 20 $\mu\text{mol/L}$	0.03 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>
大黄酸 40 $\mu\text{mol/L}$	0.29 $\pm$ 0.29	3.46 $\pm$ 3.02 <sup>bd</sup>
大黄素 40 $\mu\text{mol/L}$	0.16 $\pm$ 0.07	3.22 $\pm$ 0.25 <sup>abd</sup>
大黄酸 80 $\mu\text{mol/L}$	0.48 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	5.43 $\pm$ 1.05 <sup>abc</sup>
大黄素 80 $\mu\text{mol/L}$	0.14 $\pm$ 0.20	1.17 $\pm$ 9.26 <sup>abc</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 20  $\mu\text{mol/L}$  组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 40  $\mu\text{mol/L}$  组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 80  $\mu\text{mol/L}$  组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

注: 随着大黄酸、大黄素浓度的增高, 早、晚期细胞凋亡率相应增加, 且大黄酸各浓度组凋亡率明显高于大黄素各浓度组。

表 2 大黄酸, 大黄素 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  干预 48 h 后诱导 SD 大鼠肾小球系膜细胞的凋亡率

Table 2 Apoptotic rate of mesangial cells of Sprague-Dawley rats after treated with different concentrations (20, 40 and 80  $\mu\text{mol/L}$ ) of rhein and archen for 48 h ( $\bar{x}\pm s$ , %)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率和坏死细胞
高糖对照组	0.13 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.09
大黄酸 20 $\mu\text{mol/L}$	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.23 $\pm$ 0.17
大黄素 20 $\mu\text{mol/L}$	0.43 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	0.95 $\pm$ 0.55
大黄酸 40 $\mu\text{mol/L}$	1.83 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>	1.34 $\pm$ 1.67 <sup>d</sup>
大黄素 40 $\mu\text{mol/L}$	0.41 $\pm$ 0.34	1.05 $\pm$ 6.30
大黄酸 80 $\mu\text{mol/L}$	0.55 $\pm$ 0.38	4.76 $\pm$ 2.43 <sup>ab</sup>
大黄素 80 $\mu\text{mol/L}$	0.54 $\pm$ 0.67	2.50 $\pm$ 16.42 <sup>a</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 20  $\mu\text{mol/L}$  组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 40  $\mu\text{mol/L}$  组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 80  $\mu\text{mol/L}$  组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

注: 随着大黄酸、大黄素浓度的增高, 早、晚期细胞凋亡比例相应增加, 且大黄酸各浓度组凋亡率明显高于大黄素各浓度组。

### 3 讨论 Discussion

已有研究表明大黄酸具有抗肿瘤、抗炎、抗菌及调节肾功能等药理作用。其中大黄酸在糖尿病肾病的防治中疗效显著。肾脏肥大以及肾小球系膜细胞的积聚是临床糖尿病肾病的主要特征, 其形成主要与促生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 等因子的过度表达有关。其中转化生长因子 $\beta 1$ 在肾脏肥大、肾小球系膜细胞增殖、肾小球硬化以及肾间质纤维化发生发展起到重要作用<sup>[15-16]</sup>。在细胞凋亡方面, 大黄酸调控作用可能存在着多个调控点, 大黄酸可以下调 *bcl-2* 基因的表达, 改变 *Bcl-2/Bax* 比率, 大黄酸通过下调 *c-myc* 基因的表达来抑制鼻咽癌细胞 ERK、P38MAPK 的磷酸化以及 NF- $\kappa$ B 的活性从而诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[17]</sup>。作者系列研究观察大黄酸对高糖培养的 SD 大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响, 大黄酸可促进高糖培养的肾小球系膜细胞的凋亡, 且与浓度与时间成正相关<sup>[18]</sup>。

大黄素药理活性主要包括抗肿瘤、抗炎、保护肝细胞等<sup>[19]</sup>。大黄素在抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡、影响细胞周期方面都有作用<sup>[20]</sup>。在肾脏方面研究发现大黄素可以抑制肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞和人肾成纤维细胞的增殖<sup>[21]</sup>, 在诱导细胞凋亡方面其可诱导狼疮性肾炎病人肾纤维细胞凋亡<sup>[22]</sup>。魏建波等<sup>[23]</sup>采用单侧输尿管梗阻法制备大鼠肾间质纤维化模型, 并以小、中和大剂量大黄素(25, 50, 80 mg/kg) 干预, 结果显示大黄素能改善单侧输尿管梗阻法诱导的大鼠肾间质纤维化, 其机制可能通过抑制大鼠肾组织转化生长因子 $\beta$ mRNA 表达, 发挥抗纤维化的作用。

李冬梅等<sup>[24]</sup>探讨了中药大黄素对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中基质金属蛋白酶组织抑制物1表达的影响,应用大黄素干预梗阻侧肾脏的组织学变化和TIMP-1在梗阻肾小管间质中表达情况,实验结果显示中药大黄素可以通过抑制TIMP-1的表达来发挥其延缓肾间质纤维化进程的作用,对肾脏有保护作用。

实验应用大黄酸、大黄素干预对比实验表明:低中高浓度的大黄酸、大黄素均可诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡,在凋亡的发生发展过程中,细胞形态学的变化一目了然,大黄酸促凋亡作用明显强于大黄素。镜下可见药物刺激下的细胞胞膜出现皱缩变小,随着浓度及时间的增加,细胞碎片增多,胞膜不在完整。细胞核染色质高度凝集固化,随着药物浓度的增加及时间的增加,细胞核染色质高度凝聚边缘化,完整细胞核减少,细胞核裂解为碎片,产生凋亡小体<sup>[25-26]</sup>。课题组在做组方内配伍的实验中发现大黄酸与乌头碱水解产物配伍时形成一种有活性的盐类,配伍组显示乌头碱水解产物对大黄酸的药效具有增效作用,而这种药理活性的增强与此盐有关。大黄素在其配伍方面并未发现优势。故本研究后期将重点探讨大黄酸的药理活性,探讨其可能的促凋亡分子机制,并用db/db小鼠进行复筛。

**作者贡献:** 第一作者郭禹进行实验设计、资料收集、撰写成文,实验实施为第一作者郭禹完成,实验评估为通讯作者魏群利,魏群利审校,郭禹、魏群利对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 本实验已获得所在单位的伦理委员会批注。

**学术术语:** 肾脏肥大以及肾小球系膜细胞的积聚是临床糖尿病肾病的主要特征,其形成主要与促生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 等因子的过度表达有关。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Shlipak M. Diabetic nephropathy: preventing progression. Clin Evid (Online). 2010 Jul 8;2010.
- [2] Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, et al. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. Curr Drug Targets. 2007;8(8):952-959.
- [3] 陈志红. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(2):184-186.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:22-23.
- [5] 魏群利, 陆晓和, 夏曙辉, 等. 消可宁对高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(12): 2371-2374.
- [6] 李红芬, 郑肇巽, 马品耀, 等. HE染色原理和试剂配制及染色过程中的若干问题探讨[J]. 医学信息, 2011, 24(4):1986-1986.
- [7] 田玉旺, 李琳, 朱红艳, 等. 常规HE染色易出现的问题、原因及解决方法[J]. 诊断病理学杂志, 2008, 15(6):500-502.
- [8] 王力, 杨举伦, 赵稳兴, 等. 改良Ehrlich苏木精染液在 HE染色中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(8):902-903.
- [9] Aschar-Sobbi R, Abramov AY, Diao C, et al. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. J Fluoresc. 2008; 18(5):859-866.
- [10] Smith SA, Morrissey JH. Sensitive fluorescence detection of polyphosphate in polyacrylamide gels using 4',6-diamidino-2-phenylindol. Electrophoresis. 2007;28(19): 3461-3465.
- [11] 潘春留, 闫雷, 娜仁图娜拉, 等. 流式细胞术研究细胞凋亡的方法与技术[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(4):790-793.
- [12] 吴建勇, 赵德璋. 流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(9):1386-1388.
- [13] 李超, 韩金路, 王玉刚, 等. 流式细胞仪的工作原理及应用[J]. 中国实用医药, 2009, 4(20):235-236.
- [14] Chung CY, Park YL, Song YA, et al. Knockdown of RON inhibits AP-1 activity and induces apoptosis and cell cycle arrest through the modulation of Akt/FoxO signaling in human colorectal cancer cells. Dig Dis Sci. 2012;57(2):371-380.
- [15] Gao Q, Qin WS, Jia ZH, et al. Rhein improves renal lesion and ameliorates dyslipidemia in db/db mice with diabetic nephropathy. Planta Med. 2010;76(1):27-33.
- [16] 黄娟, 陈文莉, 朱红. 大黄酸对输尿管梗阻大鼠肾组织纤维化的保护机制[J]. 中国药师, 2009, 12(11):1529-1531.
- [17] 李晓红, 李蒙, 陶艳蓉. 大黄酸及其衍生物药理作用研究新进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6):417-421.
- [18] 郭禹, 李岩, 房卉, 等. 大黄酸可影响高糖培养SD大鼠肾小球系膜细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(40):7503-7507.
- [19] 刘冠贤, 叶任高, 谭志明, 等. 大黄素对狼疮性肾炎成纤维细胞生物学行为的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(3):196-198.
- [20] 姜春玲. 系膜细胞的功能对肾小球滤过作用的影响[J]. 大连医科大学学报, 2003, 25(1):67-69.
- [21] 李杰, 张陆勇, 江振洲. 大黄素的药理学研究近况[J]. 药学进展, 2005, 29(12):540-543.
- [22] Su YT, Chang HL, Shyue SK, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. Biochem Pharmacol. 2005;70(2):229-241.
- [23] 魏建波, 刘琴, 钟瑜, 等. 大黄素对大鼠肾间质纤维化干预作用的实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23(5):337-338.
- [24] 李冬梅, 孙禄, 刘巍, 等. 大黄素对肾纤维化大鼠肾组织中基质金属蛋白酶组织抑制物-1表达的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 17:2689-2691.
- [25] 金国华, 房向东. 大黄素在延缓肾脏纤维化过程中的作用[J]. 山东医药, 2011, 51(32):114-115.
- [26] 董华玲, 马华. 中药芪红合剂对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中基质金属蛋白酶组织抑制剂-1表达的影响[J]. 中国医药导报, 2008, 5(28):5-8.