

# 灯盏花素对肾损害模型小鼠肾脏TGF- $\beta_1$ 、Col-IV表达的影响

李向平<sup>1\*</sup>, 马菲<sup>2</sup>, 张印坡<sup>3</sup>, 任亮<sup>3</sup>(1. 济源市人民医院, 河南 济源 454650; 2. 漯河市源汇区妇幼保健院, 河南 漯河 462002; 3. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0213-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.07

**摘要** 目的: 研究灯盏花素对肾损害模型小鼠肾功能和转化生长因子(TGF)- $\beta_1$ 、IV型胶原蛋白(Col-IV)表达的影响。方法: 腹腔注射顺铂8 mg/kg以复制小鼠肾损害模型。实验分为对照(5%羧甲基纤维素钠)、模型(5%羧甲基纤维素钠)与灯盏花素高、低剂量(50, 25 mg/kg)组。灌胃给药, 每天1次, 连续7 d。给药结束后HE染色观察大鼠肾组织改变, 进行肾脏指数、尿蛋白(Upr)/肌酐(Ucr)比值、N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG-U)等肾功能指标测定; 免疫组化法检测肾组织TGF- $\beta_1$ 、Col-IV的表达。结果: 病理切片显示高、低剂量灯盏花素可显著改善顺铂致肾损害小鼠的肾组织结构。与模型组比较, 灯盏花素高、低剂量组小鼠肾脏指数、Upr/Ucr比值与NAG-U活性均显著下降( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ), Col-IV表达显著增强( $P < 0.05$ ); 灯盏花素高剂量组小鼠肾组织TGF- $\beta_1$ 表达显著下降( $P < 0.05$ )。结论: 灯盏花素对顺铂致肾损害小鼠肾脏具有保护作用, 其机制可能与下调肾组织TGF- $\beta_1$ 及上调Col-IV的表达有关。

**关键词** 顺铂; 肾损害; 转化生长因子- $\beta_1$ ; IV型胶原蛋白

## Effect of Breviscapine on the Expressions of TGF- $\beta_1$ and Col-IV in Mice with Renal Impairment

LI Xiang-ping<sup>1</sup>, MA Fei<sup>2</sup>, ZHANG Yin-po<sup>3</sup>, REN Liang<sup>3</sup>(1. The People's Hospital of Jiyuan City, Henan Jiyuan 454650, China; 2. Yuanhui District Women and Children Health Care Hospital of Luohe City, Henan Luohe 462002, China; 3. Luohe Medical College, Henan Luohe 462002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effect of breviscapine on renal function and the expression of TGF- $\beta_1$  and Col-IV in mice with renal impairment. METHODS: Renal impairment model was induced by intraperitoneal injection of cisplatin (8 mg/kg). Mice were randomly divided into control group (5% CMC-Na), model group (5% CMC-Na), breviscapine high-dose and low-dose groups (50, 25 mg/kg). They were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 7 days. Changes of renal tissue was observed by HE staining after medication, and renal index, ratio of Upr to Ucr, NAG-U and other renal function index were determined; the expression of TGF- $\beta_1$  and Col-IV in renal tissues were determined by immunohistochemical method. RESULTS: Pathological examinations showed that high-dose, low-dose breviscapine improved the renal tissue of mice with cisplatin-induced renal impairment. Compared with model group, renal index, Upr/Ucr ratio and NAG-U were significantly down-regulated in breviscapine high-dose and low-dose groups ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), and the expressions of Col-IV increased ( $P < 0.05$ ). The expressions of TGF- $\beta_1$  in breviscapine high-dose group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). CONCLUSION: Breviscapine could improve the kidney functions of mice with renal impairment, which may be related to the down-regulation of the expressions of TGF- $\beta_1$  and up-regulation of the expression of Col-IV.

**KEY WORDS** Cisplatin; Renal impairment; TGF- $\beta_1$ ; Col-IV

顺铂(Cisplatin, CDDP)是常用抗癌药, 对迁移性生殖细胞癌疗效显著。但有报道指出, 使用单一剂量顺铂治疗后大约有25%~30%的患者会出现不同程度的肾损害<sup>[1]</sup>。因此, 如何有效防治顺铂的肾损害成为临床关注的重要问题。灯盏花素(Breviscapine, Bre)是从菊科植物灯盏细辛中提取的类黄酮成分, 在防治多种肾脏疾病方面显示出较好的临床应用<sup>[2]</sup>。本研究通过观察灯盏花素对顺铂致肾损害小鼠肾功能及肾组织转化生长因子(TGF)- $\beta_1$ 与IV型胶原蛋白(Col-IV)的影响, 探究灯盏花素防治顺铂肾毒性的机制。

## 1 材料

\* 副主任药师, 执业药师。研究方向: 药事管理、合理用药。电话: 0391-6655221。E-mail: xpli-003@163.com

### 1.1 仪器

AU 2700型全自动生化分析仪、BX40型光学显微镜(日本Olympus公司); FA1004型电子天平(上海分析天平厂); HPIAS 21000型彩色病理分析系统(华中科技大学同济医学院千屏影像工程公司)。

### 1.2 药品与试剂

注射用灯盏花素(昆明龙津药业股份有限公司, 批号: 20100915, 规格: 25 mg/瓶); 注射用顺铂(山东齐鲁制药厂, 批号: 908027CF, 规格: 20 mg/瓶); 尿蛋白(Upr, 批号: 091116)、肌酐(Ucr, 批号: 100320)、N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG-U, 批号: 100415)检测盒均由南京建成生物工程技术有限公司提供; 兔抗鼠Col-IV多克隆抗体(批号: 091215)、兔抗鼠TGF- $\beta_1$ 多克隆

抗体(批号:091106)均由武汉博士德生物技术有限公司提供;其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

清洁级昆明种小鼠40只,♀♂兼用,体质量18~22g,由河南医学实验动物中心提供(动物生产许可证号:医动字第410115号)。

## 2 方法

### 2.1 复制模型与分组、给药

注射用顺铂用生理盐水稀释后以8mg/kg剂量单次ip以复制肾损害小鼠模型。实验分为4组,即对照(5%羧甲基纤维素钠)、模型(5%羧甲基纤维素钠)与灯盏花素高、低剂量(50、25mg/kg)组。复制模型后ig给药,每天1次,连续7d。

### 2.2 标本收集与肾功能测定

末次给药后2d,收集小鼠代谢笼中尿液,稀释至相同倍数(约2ml),测定Upr/Ucr与NAG-U等肾功能相关指标。将小鼠用乌拉坦麻醉后摘取两侧肾脏,称质量后计算肾脏指数(肾脏指数=肾脏质量/体质量)。

### 2.3 肾组织结构的观察

小鼠肾脏以10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片,HE染色后光镜下观察肾组织病理结构的改变。

### 2.4 肾组织中TGF-β<sub>1</sub>与Col-IV的免疫组化分析

对TGF-β<sub>1</sub>与Col-IV的分析采用二步法进行,步骤按照说明书操作。TGF-β<sub>1</sub>与Col-IV的阳性物质为棕黄色,主要位于肾小球与肾小管细胞间质。每组3张切片,每张切片在高倍镜下(400×)随机选取不重复的10个视野,显色强度采用HPIAS21000型高清晰彩色病理图文分析系统,染色强度以吸光度(OD)值表示。

### 2.5 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 $t$ 检验,通过SPSS11.0软件完成。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 灯盏花素对模型小鼠肾组织结构的影响

对照组小鼠肾组织基本正常;模型组小鼠肾小球萎缩,肾小管上皮细胞变性、坏死,肾小管管腔变窄,肾间质水肿,充血伴炎性细胞浸润明显;灯盏花素低剂量组小鼠肾小管基本正常,以肿胀为主,存在肾间质水肿、充血、炎性细胞浸润等,但较模型组小鼠程度明显减轻;灯盏花素高剂量组小鼠肾小球正常,部分肾小管以肿胀为主,但肾间质水肿、充血、炎性细胞浸润不明显。小鼠肾组织结构见图1。

### 3.2 灯盏花素对模型小鼠肾功能的影响

与对照组比较,模型组小鼠的肾脏指数、NAG-U活性与Upr/Ucr比值显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,灯盏花素高、低剂量组小鼠的肾脏指数、NAG-U活性与Upr/Ucr比值显著降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。说明灯盏花素可有效保护顺铂引起的肾损害小鼠的肾功能。灯盏花素对模型小鼠肾功能的影响见表1。

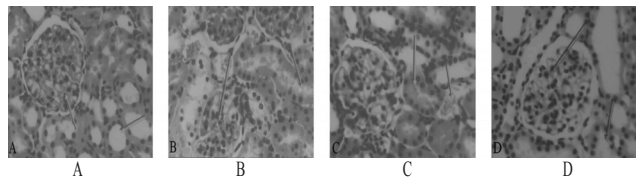


图1 小鼠肾组织结构(HE,400×)

A.对照组;B.模型组;C.灯盏花素低剂量组;D.灯盏花素高剂量组

Fig 1 renal tissue in mice (HE,400×)

A. control group; B. model group; C. briviscapine low-dose group; D. briviscapine high-dose group

表1 灯盏花素对模型小鼠肾功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 1 Effect of briviscapine on renal function in model mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量,mg/kg	肾脏指数,mg/g	Upr/Ucr	NAG-U,U/mg
对照组		3.28 ± 0.35	0.58 ± 0.29	58.70 ± 2.60
模型组		6.79 ± 0.42*	0.79 ± 0.52*	80.50 ± 5.26*
灯盏花素低剂量组	25	4.88 ± 0.49 <sup>#</sup>	0.64 ± 0.34 <sup>#</sup>	67.33 ± 2.16 <sup>#</sup>
灯盏花素高剂量组	50	3.58 ± 0.57 <sup>##</sup>	0.58 ± 0.17 <sup>##</sup>	55.13 ± 2.30 <sup>##</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

vs. control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

### 3.3 灯盏花素对模型小鼠肾组织中TGF-β<sub>1</sub>与Col-IV表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠肾组织中TGF-β<sub>1</sub>阳性表达显著增加,Col-IV阳性表达显著减弱( $P < 0.01$ )。与模型组比较,灯盏花素高剂量组小鼠TGF-β<sub>1</sub>表达显著减弱,Col-IV表达显著增强( $P < 0.05$ ),灯盏花素低剂量组Col-IV表达显著增强( $P < 0.05$ )。说明灯盏花素可能通过抑制TGF-β<sub>1</sub>途径或促进Col-IV的修复而发挥保护肾脏作用。灯盏花素对模型小鼠肾组织中TGF-β<sub>1</sub>与Col-IV表达的影响见图2、图3、表2。

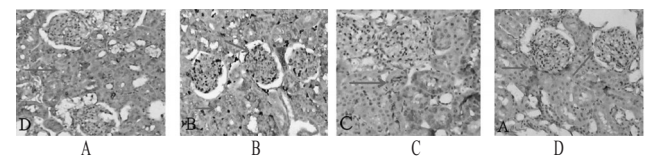


图2 灯盏花素对顺铂致肾损害小鼠肾组织中TGF-β<sub>1</sub>表达的影响(400×)

A.灯盏花素高剂量组;B.模型组;C.灯盏花素低剂量组;D.对照组

Fig 2 Effect of briviscapine on the expression of TGF-β<sub>1</sub> in renal tissue of mice with cisplatin-induced renal impairment (400×)

A. briviscapine high-dose group; B. model group; C. briviscapine low-dose group; D. control group

## 4 讨论

顺铂是治疗转移性生殖细胞癌最常用的药物之一,其疗效与用药剂量成正比,但剂量的增加又受到顺铂肾毒性的限制。目前,临床上对高剂量顺铂造成的肾毒性的防治主要采用改变给药方式或途径、应用抗氧化剂或利尿剂、应用补肾中药等几种方式,而上述方式都存在不同缺陷。因此,如何切实有效地保证和提高肿瘤患者的化疗质量,减轻肾损伤,更好地发挥顺铂的抗肿瘤作用,已成为一个很重要的研究课题。

24h Upr是反映肾损害的重要指标之一,与肾损害呈正相

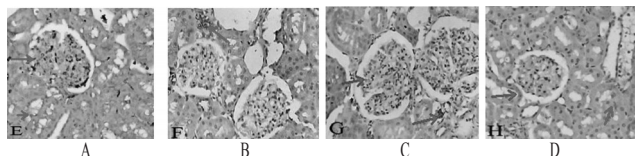


图3 灯盏花素对顺铂致肾损害小鼠肾组织中Col-IV表达的影响(400×)

A.对照组;B.模型组;C.灯盏花素低剂量组;D.灯盏花素高剂量组

Fig 3 Effect of briviscapine on the expression of Col-IV in renal tissue of mice with cisplatin-induced renal impairment (400×)

A. control group; B. model group; C. briviscapine low-dose group; D. briviscapine high-dose group

表2 灯盏花素对模型小鼠肾组织中TGF-β<sub>1</sub>、Col-IV表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 2 Effect of briviscapine on the expression of TGF-β<sub>1</sub> and Col-IV in renal tissue of model mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量,mg/kg	TGF-β <sub>1</sub>	Col-IV
对照组		28.80 ± 5.41	57.83 ± 4.61
模型组		50.22 ± 6.53*	37.53 ± 5.58*
灯盏花素低剂量组	25	43.07 ± 4.62	49.39 ± 6.41 <sup>#</sup>
灯盏花素高剂量组	50	40.80 ± 4.44 <sup>#</sup>	50.30 ± 5.58 <sup>#</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$

vs. control group: \* $P < 0.05$ ; vs. model group: <sup>#</sup> $P < 0.05$

关<sup>[3]</sup>。但对于动物实验而言,收集小鼠24 h尿液标本非常烦琐费时,因此在本研究中选择Upr/Ucr比值评估顺铂肾损害的程度,并以NAG-U与肾脏指数作为参照。实验结果证明,尿液Upr/Ucr比值同NAG-U与肾脏指数等指标一样,均可反映顺铂致肾损害小鼠肾损害的程度。

灯盏花素是从灯盏花中提取的类黄酮成分,在防治糖尿病肾病、高血压肾病等方面具有良好的应用。笔者前期研究发现,灯盏花素与马利兰在体外具有协同抗肿瘤作用<sup>[4]</sup>;同时在借鉴灯盏花素治疗糖尿病肾病的用量与方法的基础上,发现25、50 mg/kg剂量灯盏花素可通过抗氧化作用改善顺铂致肾损害小鼠的肾结构,减轻顺铂的肾毒性,对顺铂损伤后的肾脏具有良好的保护作用<sup>[5]</sup>,因此在本研究中依然采取上述剂量进行相关实验。

近年研究表明,多种细胞因子分泌增多和细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)蛋白代谢异常在顺铂致肾损害中发挥重要作用,而其中TGF-β<sub>1</sub>为顺铂致肾损害中肾小球与肾小管间质损伤较为肯定的生长因子,且多种损伤介质最终是通过诱导TGF-β<sub>1</sub>增加致肾脏损害<sup>[6]</sup>。顺铂中的重金属离子Pt

可以与细胞核中DNA形成Pt-DNA加合物,通过抑制DNA的复制和转录,最终破坏Col-IV等成分,使ECM产生局部的缺损。本研究亦说明,高剂量使用顺铂所引起的肾损害如肾小球缺血、肾小管坏死以及间质损伤,与TGF-β<sub>1</sub>表达的上调具有密切相关性。Col-IV等为ECM中的主要成分,在细胞黏附、增殖及浸润转移中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。杜刚军等<sup>[8]</sup>的研究表明,灯盏花素对小鼠肺纤维化的保护作用与抑制肺组织TGF-β<sub>1</sub>的表达密切相关,那么灯盏花素对顺铂致肾损害小鼠的保护作用是否与TGF-β<sub>1</sub>及Col-IV存在一定的相关性呢?本研究表明,灯盏花素可抑制顺铂致肾损害小鼠肾组织TGF-β<sub>1</sub>的表达,提高Col-IV的表达,证明灯盏花素可能是通过抑制TGF-β<sub>1</sub>及修复Col-IV等作用防治顺铂引起的急性肾损害。这一作用基础可能对防治组织纤维化及其相关疾病具有积极意义。

(本研究由漯河市2011年度科技发展计划项目和漯河医学高等专科学校2011年度科研项目共同资助)

### 参考文献

- [1] Bernsis, Ford PA. Renal toxicities of antineoplastic drugs and bone marrow transplantation[J]. *Semin Nephrol*, 1997, 17(1): 54.
- [2] 赵锦欢,张丽梅,李洋.灯盏花素对糖尿病肾病的防治作用简介[J]. *中国药业*, 2010, 19(12): 86.
- [3] 贺丹,柴华旗,黎曼.晨尿尿蛋白/尿肌酐比和24 h尿蛋白定量的临床评价[J]. *苏州大学学报:医学版*, 2004, 24(6): 861.
- [4] 任亮,马菲,李晓莉,等.灯盏花素增强马利兰抑制HL-60细胞作用的实验研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(7): 1 749.
- [5] 任亮,张印坡,徐华,等.灯盏花素对小鼠顺铂肾损害的防治作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(1): 142.
- [6] Border WA, Noble NA. Evidence that TGF-beta should be a therapeutic target in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 1998, 54(4): 1 390.
- [7] Gilbert RE, Cox A, Wu LL, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal interstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition[J]. *Diabetes*, 1998, 47(3): 414.
- [8] 杜刚军,张硕,林海红,等.灯盏花素对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(2): 160.

(收稿日期:2012-02-06 修回日期:2012-06-19)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅