

虎杖苷对大鼠肾纤维化的改善作用及其机制研究

王松*, 赵晓玉, 陈成群, 任清华, 齐跃东(郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052)

中图分类号 R285.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2635-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.14

摘要 目的:研究虎杖苷对大鼠肾纤维化的改善作用及其机制。方法:将50只大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性组(贝那普利,5 mg/kg)和虎杖苷高、低剂量组(100、50 mg/kg),每组10只,除假手术组外,其余各组大鼠均采用单侧输尿管结扎法复制肾纤维化模型。造模成功后,各给药组大鼠ig相应药物,假手术组和模型组大鼠ig 0.5%羧甲基纤维素钠溶液,每天1次,连续4周。观察肾脏组织病理变化并进行评分,检测24 h尿蛋白和血清中尿素氮、肌酐水平,检测肾脏组织中羟脯氨酸含量以及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、纤连蛋白(FN) mRNA的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠病理评分,24 h尿蛋白,血清中尿素氮、肌酐水平,肾脏组织中羟脯氨酸含量以及TGF- β_1 、FN mRNA表达水平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠24 h尿蛋白,血清中尿素氮、肌酐以及肾组织中FN mRNA表达水平均明显降低;阳性组和虎杖苷高剂量组大鼠病理评分,肾组织中羟脯氨酸含量以及肾组织中TGF- β_1 mRNA表达水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:虎杖苷能够改善单侧输尿管结扎致大鼠肾纤维化,其机制可能与其下调肾脏组织中TGF- β_1 、FN mRNA表达有关。

关键词 单侧输尿管结扎;肾纤维化;转化生长因子 β_1 ;纤连蛋白;虎杖苷;大鼠

Study on the Improvement Effects and Mechanism of Polydatin on Renal Fibrosis in Rats

WANG Song, ZHAO Xiaoyu, CHEN Chengqun, REN Qinghua, QI Yuedong (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of polydatin on renal fibrosis in rats and its mechanism. METHODS: 50 rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive group (benazepril, 5 mg/kg) and polydatin high-dose and low-dose groups (100, 50 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for sham operation group, renal fibrosis model was induced by unilateral ureter obstruction. After modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically, and sham operation group and model group were given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution once a day for consecutive 4 weeks. The pathological change of renal tissue was scored. 24 h urinary protein and serum levels of urea nitrogen and creatinine were determined, and the content of hydroxyproline, mRNA expression of TGF- β_1 and FN were detected in renal tissue. RESULTS: Compared with sham operation group, pathological score, 24 h urinary protein, serum levels of urea nitrogen and creatinine, the content of hydroxyproline in renal tissue, mRNA expression of TGF- β_1 and FN were all increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, 24 h urinary protein, serum levels of urea nitrogen and creatinine and mRNA expression of FN in renal tissue decreased significantly in administration groups; the pathology scores, the content of hydroxyproline in renal tissue and mRNA expression of TGF- β_1 of positive group and polydatin high-dose group were all decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Polydatin can prevent kidney fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction, the mechanism of which may be associated with the mRNA expression down-regulation of TGF- β_1 and FN in renal tissue.

KEYWORDS Unilateral urethral obstruction; Renal fibrosis; TGF- β_1 ; FN; Polydatin; Rat

肾纤维化是原发性肾小球疾病、慢性肾盂肾炎、糖尿病肾病等肾脏疾病的发生至终末期肾功能衰竭的共同病理过程,主要表现为正常肾单位丢失、成纤维细胞增生、过量细胞外基质产生与堆积,导致肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[1]。肾纤维化预示着肾损伤发生以及肾功能的恶化,因此,采取有效的治疗方法对其进行干预具有十分重要的意义。

虎杖苷(3,4',5-三羟基二苯乙烯-3- β -单-D-葡萄糖苷)是从蓼科植物虎杖的干燥根茎中提取的有效成分,具有抗氧化、抗炎、免疫调节、改善糖脂代谢、脏器保护以及心血管疾病治疗作用^[2]。在果糖诱导的尿酸肾病小鼠模型中,虎杖苷可通过抑制氧化应激相关炎症反应,从而减轻肾损伤^[3]。在脓毒症诱导的急性肾损伤大鼠模型中,虎杖苷可改善肾小管上皮细胞线粒体功能障碍,从而减轻肾损伤^[4]。以上结果提示,虎杖苷在肾脏疾病中具有积极的改善效果,但有关虎杖苷干预肾纤

维化进程的研究至今尚未见报道。单侧输尿管结扎大鼠肾纤维化模型操作简单、病变均一、重复性良好,是评价肾纤维化药物治疗的重要模型^[5]。故在本研究中,笔者拟观察虎杖苷对单侧输尿管结扎大鼠肾纤维化的影响,旨在为临床上采用中药有效成分防治肾纤维化提供参考。

1 材料

1.1 仪器

7600型全自动生化分析仪(日本日立公司);Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo公司);HH-501型恒温水浴箱(金坛市成辉仪器厂);T100型反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增仪(美国Bio-Rad公司);BX50型光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

虎杖苷(南京青泽医药科技开发有限公司,批号:20141106,纯度: $\geq 98\%$);盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号:140109,规格:10 mg/片);羧甲基纤维素钠(美国Sigma公

* 主管药师,硕士。研究方向:药品调剂、临床药学。E-mail: 470373072@qq.com

司,批号:86H1015);羟脯氨酸、尿蛋白定量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140923、20150112);总RNA抽提试剂、RNA逆转录试剂盒和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、纤连蛋白(FN)mRNA引物序列由上海生工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Wistar大鼠50只,♂,体质量160~180g,由郑州大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(豫)2011-0004]。标准饲料喂养,自由进水和进食,适应性饲养1周后进行实验。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

2.1.1 分组 将50只大鼠随机分为5组,即假手术组、模型组、阳性组和虎杖苷高、低剂量组,每组10只。

2.1.2 造模^[6] 除假手术组外,其余各组大鼠均进行造模。通过ip 10%水合氯醛(4 ml/kg)将大鼠麻醉后,将大鼠右侧卧位固定于手术台上,常规备皮消毒,行左侧腹切口,逐层分离组织直至腹膜,暴露并游离左侧输尿管,分别用丝线结扎输尿管上1/3处以及中1/3处,再在两结扎点之间切断输尿管,最后逐层缝合。假手术组大鼠仅打开腹腔和游离左侧输尿管,不结扎,不切断。造模后,可通过肾脏组织病理观察到炎症细胞浸润,胶原成分增加,结扎侧肾脏明显增大,肾小管上皮细胞变性、脱落甚至坏死,肾小管部分萎缩或者扩张,即表明造模成功。

2.1.3 给药 手术完成后1h开始给药:虎杖苷高、低剂量组大鼠分别每天ig 100、50 mg/kg虎杖苷(预实验结果显示,100 mg/kg虎杖苷能明显改善模型大鼠肾功能,故以此为本实验高剂量,其0.5倍剂量为本实验低剂量),假手术组、模型组大鼠每天ig等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液,阳性组大鼠每天ig 5 mg/kg贝那普利溶液(给药剂量为贝那普利人临床用量的日常剂量,根据大鼠与人的体表面积系数换算),连续4周。

2.2 标本采集

给药4周后将大鼠处死,在处死前1d,将大鼠置于代谢笼中收集24h尿液,按照试剂盒说明书测定24h尿蛋白。在大鼠处死前,经心脏取血,以离心半径为15 cm、3 000 r/min离心15 min,取上清液,采用全自动生化分析仪测定血清中尿素氮和肌酐水平。取血完成后将大鼠处死,迅速取肾脏组织,一部分用4%多聚甲醛固定,用于观察病理形态;另一部分于-80℃条件下保存,用于指标检测。

2.3 肾脏组织病理变化观察

将4%多聚甲醛固定的肾脏组织制成4 μ m厚切片,行苏木精-伊红(HE)染色,在400倍光镜下观察其病理变化,采用半定量法判断肾间质损伤情况。参考Banff分级评分^[7]:0分表示肾组织无肾小管扩张、萎缩、坏死等病理变化;1分表示轻度损伤,即肾小管间质病变范围 $<25\%$;2分表示中度损伤,即肾小管间质病变范围为 $26\% \sim 50\%$;3分表示严重损伤,即肾小管间质病变范围 $>50\%$ 。每张切片连续观察10个不重叠的视野,取平均值。

2.4 肾脏组织中羟脯氨酸含量的测定^[8]

精确称取100 mg肾脏组织,准确加入1 ml水解液,混匀,于95℃水解20 min。调水解液pH为6.5,取稀释水解液加入适量活性炭,混匀,以离心半径为15 cm、3 500 r/min离心10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定肾脏组织中羟脯氨酸含量。

2.5 肾脏组织中TGF- β_1 、FN mRNA表达的测定

取100 mg肾脏组织,匀浆,采用总RNA抽提试剂提取肾脏组织中总RNA,将总RNA逆转录成cDNA,以cDNA为模板

进行PCR扩增。反应体系:10 \times PCR缓冲液2.5 μ l,10 mmol/L dNTP 0.5 μ l,25 mmol/L氯化镁1.5 μ l,10 mmol/L上、下游引物各0.25 μ l,10 mmol/L探针0.25 μ l,TaqDNA聚合酶1.25 μ l,cDNA 2 μ l,再用去离子水补足至25 μ l。扩增条件:94℃、2 min;94℃、15 s,60℃、15 s,72℃、15 s,40个循环;72℃、10 min。TGF- β_1 上游引物序列:5'-TGAGTGGCTGTCTTTT-GACG-3',下游:5'-ACTGAAGCGAAAGCCCTGTA-3',82 bp;FN上游引物序列:5'-GAAAGGCAACCAGCAGAGTC-3',下游:5'-CTGGAGTCAAGCCAGACACA-3',230 bp;内参 β -actin上游引物序列:5'-GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3',下游:5'-AGAGGCTTTACGGATGTCAACGT-3',147 bp。荧光定量PCR读取循环阈值,计算目的基因 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值(表示实验组测定基因的表达式相对于正常对照组样本表达量的变化倍数),以目的基因 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为参数进行半定量分析。试验重复3次。

2.6 统计学方法

采用SPSS 18.0统计学软件进行数据处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,若方差齐性,采用LSD检验;若方差不齐,则采用Dunnett's T3检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肾脏组织病理评分结果

与假手术组(0.08 \pm 0.11)比较,模型组大鼠肾脏组织病理评分(1.89 \pm 0.36)显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性组和虎杖苷高剂量组大鼠肾脏组织病理评分[(1.6 \pm 0.33)、(1.51 \pm 0.28)]显著降低($P < 0.05$);虎杖苷低剂量组评分(1.72 \pm 0.28)降低不明显($P > 0.05$)。

3.2 各组大鼠24 h尿蛋白和血清尿素氮、肌酐水平测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠24 h尿蛋白和血清尿素氮、肌酐水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠24 h尿蛋白和血清尿素氮、肌酐水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠24 h尿蛋白和血清尿素氮、肌酐水平测定结果见表1。

表1 各组大鼠24 h尿蛋白、血清尿素氮、肌酐水平以及肾脏组织中羟脯氨酸含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Determination results of 24 h urinary protein, serum urea nitrogen and creatinine and hydroxyproline content in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	24 h尿蛋白,mg	尿素氮,mmol/L	肌酐, μ mol/L	羟脯氨酸,mg/g
假手术组		18.17 \pm 2.88	6.72 \pm 1.20	24.18 \pm 2.51	0.30 \pm 0.04
模型组		30.17 \pm 3.57 [*]	17.58 \pm 2.74 [*]	35.56 \pm 3.25 [*]	0.49 \pm 0.06 [*]
虎杖苷高剂量组	100	24.70 \pm 3.59 ^{**}	14.45 \pm 1.59 ^{**}	30.35 \pm 2.95 ^{**}	0.44 \pm 0.05 [*]
虎杖苷低剂量组	50	26.61 \pm 3.16 [*]	15.08 \pm 1.79 [*]	30.07 \pm 3.49 [*]	0.47 \pm 0.06
阳性组	5	24.38 \pm 3.27 ^{**}	14.29 \pm 1.61 ^{**}	29.81 \pm 3.02 ^{**}	0.42 \pm 0.06 [*]

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.01$; vs. model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3.3 各组大鼠肾脏组织中羟脯氨酸含量测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠肾脏组织中羟脯氨酸含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性组和虎杖苷高剂量组大鼠肾脏组织中羟脯氨酸含量显著减少($P < 0.05$)。各组大鼠肾脏组织羟脯氨酸含量测定结果见表1。

3.4 各组大鼠肾脏组织中TGF- β_1 、FN mRNA表达水平测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠肾脏组织中TGF- β_1 、FN mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药

组大鼠肾脏组织中FN mRNA表达水平显著降低;阳性组和虎杖苷高剂量组大鼠肾脏组织中TGF-β₁ mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠肾脏组织TGF-β₁和FN mRNA表达水平测定结果见表2。

表2 各组大鼠肾脏组织TGF-β₁和FN mRNA表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Determination results of mRNA expression of TGF-β₁ and FN in renal tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	TGF-β ₁	FN mRNA
假手术组		0.86±0.09	1.06±0.15
模型组		16.75±1.51*	20.16±3.14*
虎杖苷高剂量组	100	14.04±2.12**	15.92±2.37**
虎杖苷低剂量组	50	15.91±2.11	17.26±2.93*
阳性组	5	14.29±2.17**	16.13±2.45**

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

4 讨论

单侧输尿管结扎动物模型是药理学研究中广为应用的模型,结扎单侧输尿管阻塞肾脏引流系统,可引起肾脏功能急性改变以及肾脏结构慢性损伤。该模型因尿路压力持续增加、肾血流减少、静脉引流阻塞、巨噬细胞浸润、纤维细胞增殖,从而逐渐发展为肾间质纤维化^[9]。马丹等^[10]通过研究发现,在结扎输尿管后第1周,手术侧肾脏就开始出现病理变化,血清尿素氮、肌酐呈进行性升高。在本实验中,模型组大鼠的24 h尿蛋白和血清尿素氮、肌酐水平均显著高于假手术组,表明模型制备成功;虎杖苷组大鼠24 h尿蛋白和血清尿素氮、肌酐水平较模型组显著降低,并与阳性组大鼠无明显区别,说明虎杖苷能够有效改善单侧输尿管结扎大鼠的肾脏损伤。贝那普利是经典的肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂,可通过改善内皮功能、促进血管舒张、缓解氧化应激、抑制肾脏纤维化、增加肾小球滤过率、降低血压、减少蛋白尿等发挥肾脏保护作用^[11-12],故在本实验中笔者选其为阳性对照药。

羟脯氨酸是胶原蛋白的主要成分之一,约占胶原蛋白的13.4%,可通过检测组织中羟脯氨酸含量来评价胶原组织的代谢水平。羟脯氨酸为胶原纤维所特有,肾脏组织中羟脯氨酸含量与肾间质纤维化严重程度密切相关,故可选择羟脯氨酸含量作为判断肾间质纤维化严重程度的指标^[13]。在本实验中,模型组大鼠肾脏组织中羟脯氨酸含量显著高于假手术组。同时,HE染色可见模型组大鼠肾间质区域有大量胶原纤维沉积,肾间质纤维化明显,且病理评分显著高于假手术组,再次证实了单侧输尿管结扎大鼠存在肾间质纤维化。而虎杖苷高剂量组大鼠肾脏组织中羟脯氨酸含量明显降低,HE染色结果显示,肾间质纤维化程度减轻,病理评分明显低于模型组大鼠,病理评分与阳性对照组大鼠无明显区别,表明虎杖苷可以抑制单侧输尿管结扎大鼠肾脏纤维化的发生发展。

TGF-β₁是最重要的促纤维化因子,其既可通过影响层粘连蛋白和FN发挥作用,又可通过促进肾小管上皮细胞转分化为肌纤维母细胞,推进肾脏纤维化发生发展^[14]。FN是一种非胶原性α2糖蛋白,介导细胞与细胞或细胞与基质之间的黏连,维持细胞正常形态。它能够与纤维蛋白、纤维蛋白原和胶原结合,是胶原沉积于肾小管和肾间质的前提。程红新等^[15]的研究显示,单侧输尿管梗阻大鼠FN蛋白表达量随着梗阻时间的延长而增加,且与肾间质损伤程度呈正相关,提示FN蛋白合

成增加是肾间质纤维化主要表现,可促进肾间质纤维化发生发展。在本实验中,虎杖苷高剂量组大鼠肾脏组织中TGF-β₁、FN mRNA表达水平显著低于模型组,提示虎杖苷有可能通过抑制肾脏组织中TGF-β₁、FN mRNA的表达,延缓肾间质纤维化发生发展,从而保护单侧输尿管结扎大鼠的肾脏组织。

综上,虎杖苷能够预防单侧输尿管结扎导致的大鼠肾纤维化,其机制可能与下调肾脏组织中TGF-β₁、FN mRNA表达有关。

参考文献

- [1] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12):684.
- [2] Du QH, Peng C, Zhang H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics[J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(11):1347.
- [3] Chen L, Lan Z, Liu Q, et al. Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2012.10.037.
- [4] Gao Y, Zeng Z, Li T, et al. Polydatin inhibits mitochondrial dysfunction in the renal tubular epithelial cells of a rat model of sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Anesth Analg*, 2015, 121(5):1251.
- [5] Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(11):1145.
- [6] 乔晞,赵宁,王利华,等.上调肾组织intermedin表达抑制单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2015, 4(1):29.
- [7] Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H, et al. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter- and intraobserver variation[J]. *Transplantation*, 1995, 60(10):1083.
- [8] Uceros AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction[J]. *Int Urol Nephrol*, 2014, 46(4):765.
- [9] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(4):753.
- [10] 马丹,潘兴华,余月明,等.单侧输尿管结扎制作兔肾间质纤维化动物模型[J]. *实验动物与比较医学*, 2009, 29(6):357.
- [11] 张爱国,葛庆峰,吴曼,等.贝那普利对高血压病患者肾脏保护作用研究进展[J]. *河北医药*, 2013, 35(5):755.
- [12] 王先梅,杨丽霞,宋武战,等.盐酸贝那普利对自发性高血压大鼠肾脏纤维化的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(20):1859.
- [13] 肖洁,张惠丽,徐米清,等.冬虫草菌粉对梗阻性肾病大鼠肾组织羟脯氨酸含量及p21表达的影响[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2015, 21(4):319.
- [14] Meng XM, Tang PM, Li J, et al. TGF-β/Smad signaling in renal fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2015, doi: 10.3389/fphys.2015.00082.
- [15] 程红新,杨晓萍,蒋雅红,等.纤维连接蛋白在肾间质纤维化大鼠肾组织中的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(31):5837.

(收稿日期:2016-01-19 修回日期:2016-04-11)

(编辑:林静)