

没食子对IgA肾病模型大鼠血清与肾组织NF-κB水平的影响^Δ

王 婷^{1,2*}, 李素华¹, 李团结¹, 桑晓红^{1#} (1.新疆医科大学第一附属医院肾病科, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆医科大学附属中医医院肾病科, 乌鲁木齐 830000)

中图分类号 R285;R86 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4036-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.02

摘要 目的:研究没食子对IgA肾病大鼠血清与肾组织核转录因子-κB(NF-κB)的影响。方法:采用CCl₄+脂多糖+牛血清白蛋白联合复制大鼠IgA肾病模型。80只SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与没食子高、中、低剂量(300、150、75 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续4周。测定大鼠24 h尿蛋白量;酶标仪法测定大鼠血清NF-κB含量;免疫组化法测定大鼠肾组织NF-κB的表达;观察大鼠肾脏病理损害程度。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠24 h尿蛋白量增加,血清NF-κB含量增加,肾组织NF-κB表达增强,差异有统计学意义($P<0.05$);大鼠肾小球系膜增宽(节段)伴/不伴细胞增生,肾间质轻度纤维化,部分小管扩张。与模型组比较,没食子高、中、低剂量组大鼠24 h尿蛋白量减少;没食子高剂量组大鼠血清NF-κB含量减少,肾组织NF-κB表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$);大鼠肾脏病理情况有一定改善。结论:没食子能够减轻IgA肾病模型大鼠肾损害,其机制可能与下调NF-κB水平有关。

关键词 没食子;IgA肾病;核转录因子-κB

Effects of *Quercus infectoria* on NF-κB in Serum and Renal Tissue of IgA Nephropathy Model Rats

WANG Ting, LI Su-hua, LI Tuan-jie, SANG Xiao-hong (1.Dept. of Nephropathy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2.Dept. of Nephropathy, The TCM Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Quercus infectoria* on NF-κB in serum and renal tissue of IgA nephropathy rats. METHODS: IgA nephropathy model was induced by carbon tetrachloride+ lipopolysaccharide+BSA. 80 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and *Q. infectoria* gallnut high-dose, medium-dose and low-dose groups (300, 150, 75 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically once a day for consecutive 4 weeks. 24 h albuminuria of rats was determined. ELISA method was used to detect the content of NF-κB; Immunohistochemical method was adopted to determine the expression of NF-κB. Semi-quantitative score method was used to calculate the pathological score to observe kidney pathological damage. RESULTS: Compared with normal control group, 24 h albuminuria, serum content of NF-κB and the expression of NF-κB were all increased in model group; there was statistical significance ($P<0.05$). Glomerular mesangium (segment) rats were broadened with or without cell proliferation, and slight renal interstitial fibrosis and some tubular ectasia were found. Compared with model group, 24 h albuminuria, in *Q. infectoria* high-dose, medium-dose and low-dose groups; serum content of NF-κB and the expression of NF-κB were all decreased in *Q. infectoria* high-dose groups; there was statistical significance ($P<0.05$). renal pathological symptom was improved. CONCLUSIONS: *Q. infectoria* can relieve renal damage in IgA nephropathy model rats, and the mechanism may be related to down-regulation of NF-κB.

KEYWORDS *Quercus infectoria*; IgA nephropathy; NF-κB

没食子是没食子蜂寄生于没食子树(*Quercus infectoria-aeolivie*)上生成的虫瘿,其药用历史悠久,是我国新疆维吾尔医常用药^[1],具有固气、涩精、敛肺、止血之功效。研究发现,没食子含有的鞣质具有收敛、抗炎^[2]、抗免疫^[3]等作用。IgA肾病是全世界最常见的原发性肾小球疾病,也是我国导致终末期肾衰竭(ESRD)的主要病因。但是,目前IgA肾病发病机制尚不明确,治疗多以糖皮质激素和免疫抑制剂为主,因此对IgA肾

病的发病机制及其防治研究具有重要的临床价值。本研究拟通过观察没食子对IgA肾病模型大鼠血清及肾组织中核转录因子-κB(NF-κB)水平的影响,进一步探讨没食子对IgA肾病的作用机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Lx-20型全自动生化分析仪(美国Beckman公司);class11.A2型生物安全柜(美国Forma公司);DNP-9162型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);Motic Med 6.0A型全自动显微镜(德国Motic公司);MDF-382E型超低温冰箱(日本Sanyo公司);KDC-40型低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);TGL213型高速台式离心机(上海离心机厂);Model 550型酶标仪(美国Bio-Rad公司);LKB-5型超薄切片

^Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区心血管病重点实验室开放课题(No.XJDX-0903-2011-06)

* 硕士研究生。研究方向:肾小球疾病。E-mail:cherry810131@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:肾小球疾病。E-mail:susan0126@163.com

机(瑞典LKB公司);JEOL1230型透射电子显微镜(日本电子公司);GSP-9080MBE型隔水式恒温培养箱(上海博迅医疗设备公司)。

1.2 药材

没食子购于新疆维吾尔医医院,由新疆医科大学附属中医医院聂继红主任药师鉴定为真品。

1.3 试剂

牛血清白蛋白(美国Roche公司);脂多糖(LPS,美国Sigma公司);FITC标记的兔抗鼠IgA抗体(美国Dako公司);NF- κ B多克隆兔抗鼠抗体(一抗,武汉博士德生物工程有限公司);兔IgG抗体-HRP多聚体(二抗,北京中杉金桥生物公司);24 h尿蛋白定量试剂盒(南京建成科技有限公司);NF- κ B试剂盒(上海裕平生物科技有限公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,天津市恒兴化学试剂制造有限公司);CCl₄(苏州白与化工有限公司)。

1.4 动物

12周清洁级健康SD大鼠80只,♂,体质量180~240 g,由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(新)2011-0001]。于新疆医科大学实验动物研究中心饲养,室温20~24℃,相对湿度40%~70%。给予普通饲料1周,自由饮水摄食。

2 方法

2.1 没食子溶液的制备

没食子常规粉碎,过200目筛,用CMC-Na制备成混悬液,质量分数为1%,贮藏,备用。

2.2 复制模型与分组、给药

参考文献^[5-6]ig牛血清白蛋白(600 mg/kg),隔天1次,连续12周;sc CCl₄(蓖麻油0.3 ml+ CCl₄ 0.10 ml),每周1次,连续12周,尾iv LPS(0.05 mg,第8周开始,每天1次,连续1周),以复制大鼠IgA肾病模型。80只SD大鼠随机均分为5组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与没食子高、中、低剂量(300、150、75 mg/kg)组。ig给药,每天1次,连续4周。

2.3 病理切片观察

采用生理盐水加肝素经肾动脉灌注大鼠左、右肾,尽可能减少肾组织残留血液,摘除双肾,于冠状面切5 mm厚的肾组织,置于10%中性甲醛中固定,均取左肾冠状面切0.3 cm厚的肾组织切片备石蜡包埋,余肾组织立即用冻存管分装后液氮速冻后移至-70℃贮藏,备用。

2.4 指标的测定

2.4.1 大鼠尿样的采集与测定 每天观察大鼠一般状况,末次给药时置代谢笼中收集大鼠24 h尿量,考马斯亮蓝法测24 h尿蛋白量。

2.4.2 大鼠血清NF- κ B含量的测定 末次给药24 h后,大鼠腹主动脉取血,以离心半径为12.8 cm、3 500 r/min离心10 min,分离上清液,酶标仪检测大鼠血清中NF- κ B含量。

2.4.3 大鼠肾组织NF- κ B表达的测定 腹主动脉取血后处死大鼠,大鼠肾组织于10%中性甲醛固定24 h后常规脱水透明,石蜡包埋,切片片厚3 μ m,染色前需将切片置于60℃干燥箱内脱蜡40 min。严格按照说明书进行操作。对每个标本观察者盲法随机观察10个低倍视野(200 \times),并用数码相机进行摄影,将图像输入电脑用软件进行分析。阳性细胞呈棕色,计算阳性细胞数与总细胞数的百分比,以均值表示每例肾组织NF- κ B的表达水平。

2.5 统计学方法

采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

模型复制过程中,无一例大鼠死亡,给药第1周大鼠均出现食欲不振,体质量减轻,约2周后恢复正常。给药4周后没食子高剂量组9只大鼠死亡,没食子中剂量组6只大鼠死亡,没食子低剂量组2只大鼠死亡,死亡大鼠解剖后可见肠壁扩张,充血;没食子中剂量组出现1例肝脏结节。死亡大鼠脏器观察见图1。

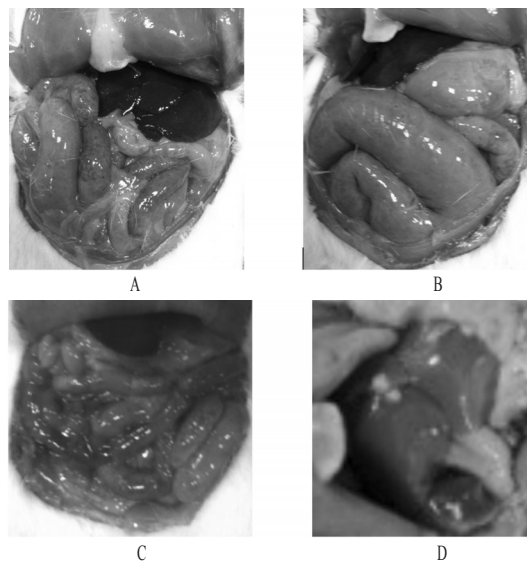


图1 死亡大鼠脏器观察

A.肠扩张;B.胃肠扩张;C.肠壁充血;D.肝脏结节

Fig 1 Organ observation of death rats

A.dilatation of intestine; B.dilatation of stomach; C.intestinal wall congestion; D.liver nodule

3.2 大鼠肾组织病理切片观察

正常对照组大鼠肾小球形态正常,未见明显异常;模型组大鼠肾小球系膜增宽(节段)伴/不伴细胞增生,肾间质轻度纤维化,部分小管扩张;没食子高、中、低剂量组大鼠肾小球系膜轻度增宽,肾间质纤维化不明显,毛细血管祥开放良好。大鼠肾组织病理切片见图2。

3.3 没食子对模型大鼠24 h尿蛋白量的影响

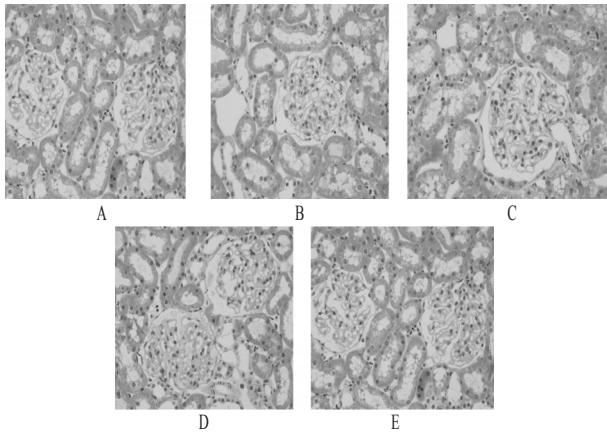


图2 大鼠肾组织病理切片(HE染色, 400×)

A.正常对照组;B.模型组;C.没食子高剂量组;D.没食子中剂量组;E.没食子低剂量组

Fig 2 Pathological section of renal tissue of rats (HE staining, 400×)

A.normal control group;B.model group;C.*Q. infectoria* high-dose group; D.*Q. infectoria* medium-dose group;E.*Q. infectoria* low-dose group

与正常对照组比较,模型大鼠24 h尿蛋白量增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,没食子高、中、低剂量组大鼠24 h尿蛋白量减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。没食子对模型大鼠24 h尿蛋白量的影响见表1。

表1 没食子对模型大鼠24 h尿蛋白量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of *Q. infectoria* on 24h quantity of urinary protein in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h尿蛋白量,mg/24 h
正常对照组	16	216.59 ± 75.86
模型组	16	759.15 ± 153.83*
没食子低剂量组	14	425.79 ± 202.99*
没食子中剂量组	10	206.86 ± 67.78*
没食子高剂量组	7	223.28 ± 87.43*

与正常对照组: * $P<0.05$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs.normal control group: * $P<0.05$;vs.model group: * $P<0.05$

3.4 没食子对模型大鼠血清NF-κB含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清NF-κB含量增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,没食子高剂量组大鼠血清NF-κB含量减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。没食子对模型大鼠血清NF-κB含量的影响见表2。

表2 没食子对模型大鼠血清NF-κB含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of *Q. infectoria* on NF-κB level of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB,ng/L
正常对照组	16	90.59 ± 1.28
模型组	16	92.74 ± 3.64*
没食子低剂量组	14	95.58 ± 6.91
没食子中剂量组	10	93.37 ± 2.25
没食子高剂量组	7	89.73 ± 2.40*

与正常对照组: * $P<0.05$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs.normal control group: * $P<0.05$;vs.model group: * $P<0.05$

3.5 没食子对模型大鼠肾组织中NF-κB表达的影响

NF-κB阳性染色为棕褐色颗粒,主要表达于肾近曲小管上皮细胞胞浆内,以萎缩的近曲小管明显,系膜区偶有染色。与正常对照组比较,模型组大鼠肾组织NF-κB表达增强,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,没食子高剂量组大鼠肾组织NF-κB表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。NF-κB的表达见图3;没食子对模型大鼠肾组织NF-κB表达的影响见表3。

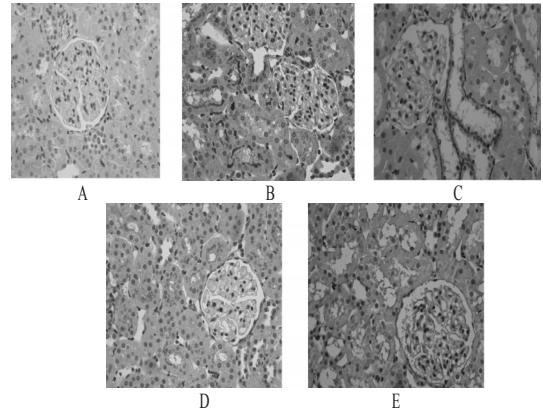


图3 NF-κB的表达(免疫组化染色, 400×)

A.正常对照组;B.模型组;C.没食子高剂量组;D.没食子中剂量组;E.没食子低剂量组

Fig 3 The expression of NF-κB (immunohistochemical staining, 400×)

A.normal control group; B.model group; C.*Q. infectoria* high-dose group; D.*Q. infectoria* medium-dose group; E.*Q. infectoria* low-dose group

表3 没食子对模型大鼠肾组织NF-κB表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of *Q. infectoria* on positive expression of NF-κB in renal tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	表达面积, %
正常对照组	16	6.37 ± 1.16
模型组	16	61.39 ± 3.51*
没食子低剂量组	14	55.89 ± 3.28
没食子中剂量组	10	42.14 ± 1.87
没食子高剂量组	7	39.32 ± 3.05*

与正常对照组: * $P<0.05$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs.normal control group: * $P<0.05$;vs.model group: * $P<0.05$

4 讨论

IgA肾病是以IgA抗体在肾小球系膜区沉积,形成免疫复合物为特征的肾小球疾病。目前已经成为全球最常见的肾小球疾病,其发病机制目前仍不明确。IgA肾病常伴不同程度肾间质病变,其受累程度影响其转归及预后。Bogenschutz O^[6]等提出肾脏间质纤维化可预测其病变程度。笔者采用CCL₄+LPS+牛血清白蛋白复制模型,与正常对照组比较,模型组大鼠24 h尿蛋白量、血清NF-κB含量增加,肾组织NF-κB表达增强。

蛋白尿是IgA肾病常见的临床表现之一,蛋白尿量的严重程度与IgA肾病的预后密切相关^[7],有效地减少蛋白尿量能改

善IgA肾病的预后^[8]。本研究结果表明,不同剂量没食子可明显降低模型大鼠24 h尿蛋白量($P<0.05$),其减少程度呈剂量依赖性。

NF- κ B是由SEN等首先从B淋巴细胞核提取的一种核蛋白。NF- κ B作为一种接到细胞内信号转导的主要转录因子,可能参与IgA肾病的发生发展。当NF- κ B被活化后间接或直接激活体内免疫炎症,加重肾脏损伤,引起血尿、蛋白尿^[9],因此NF- κ B活性的调节与多种肾脏疾病,如肾小球肾炎及肾纤维化等密切相关^[10]。本研究结果显示,模型组大鼠肾组织NF- κ B活化增强,且与24 h尿蛋白量、血清NF- κ B水平呈正相关,正常组织中表达较弱。另外,NF- κ B在模型组大鼠肾小管中活化增强,其肾小管间质损伤程度与NF- κ B的表达程度呈正相关,这与国外文献^[11]报道一致。提示没食子能够抑制模型大鼠肾组织NF- κ B活性,减少其在肾组织中的表达。

没食子为维吾尔医常用药,具有止血、消炎等作用。本研究结果表明,该药能减少IgA肾病模型大鼠24 h尿蛋白量与血清NF- κ B水平,抑制NF- κ B在肾组织中的表达。提示没食子可能通过抑制NF- κ B活化而减少炎性细胞浸润和各种炎症因子生成,从而起到肾脏保护作用。目前对没食子的药理及毒理研究相对较少,研究过程中笔者发现虽然其能有效减少血尿,但用药期间大鼠出现食欲降低,肠腔扩张,肠壁充血、水肿等,因此出现了文中的剂量越高死亡率越高的现象。与李治建等^[12]的没食子急性毒理实验相一致,说明没食子对胃肠道有一定的刺激。另外还有研究发现没食子可出现肝细胞水肿及轻度的点状坏死,肾小管上皮细胞水肿,肾间质出血^[13]。本研究中大鼠也出现肝脏结节,不排除没食子引起了肝细胞损害。

综上,没食子能够明显减轻IgA肾病模型大鼠的24 h尿蛋白量,减少模型大鼠血清NF- κ B含量,其机制可能与下调NF- κ B水平抑制炎症因子释放有关。另一方面,没食子可刺激胃肠道,严重者可出现肠壁出血,长期应用是否会导致肾间质及其他损害,有待进一步研究。

参考文献

[1] 王教玉,张起辉,邓旭明,等,没食子的药理研究进展[J].

时珍国医国药,2007,18(10):2 570.

- [2] 王彩芳,刘延泽.鞣质生理活性研究进展[J].国外医学:中医药分册,2001,23(5):278.
- [3] 杜国成.中药鞣质成分的药理作用探析[J].中国医药科学,2011,16(1):26.
- [4] 霍仕霞,彭晓明,高莉,等.维药没食子血清药化初步研究[J].中成药,2011,33(10):1 754.
- [5] 张静,李静.运用两种BSA剂量建立IgA肾病大鼠模型观察[J].中国中西医结合肾病杂志,2013,14(1):13.
- [6] Bogenschutz O, Bohle A, Batz C, et al. IgA nephritis: on the importance of morphological and clinical parameters in the long-term prognosis of 239 patients [J]. *Am J Nephrol*,1990, 10(20):137.
- [7] Lee H, Kim DK, Joo KW, et al. Mortality of IgA nephropathy patients: a single center experience over 30 years [J]. *PLoS One*,2012,7(12):1 225.
- [8] Barbour Sean J, Heather N, Heather N. Risk stratification of patients with IgA nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2012,59(6):865.
- [9] 张爱华,黄松明,丁桂霞,等.NF- κ B/IB信号通路在阿霉素肾病发病机制中的作用[J].实用医学杂志,2003,19(6):591.
- [10] Barratt J, Feehally J. IgA nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16(7):2 088.
- [11] Silva GE, Costa RS, Ravinal RC, et al. NF- κ B expression in IgA nephropathy[J]. *Dis Markers*,2011,31(1):9.
- [12] 李治建,阿不都吉力力·阿不都艾尼,孟繁龙,等.没食子提取物小鼠急性毒性试验研究[J].时珍国医国药,2011,22(11):2 630.
- [13] 卡思木江·阿西木江,木巴拉克,哈木拉提·吾甫尔.没食子灌肠剂对小鼠的急性毒性试验[J].海峡药学,2011,23(9):29.

(收稿日期:2014-02-28 修回日期:2014-08-26)

《中国药房》杂志自2015年1月起改为旬刊出版

为了实施期刊精品战略,提高期刊的整体质量,打造期刊的核心竞争力,降低期刊的运营成本,促进期刊的健康、可持续发展,使期刊在激烈的竞争中立于不败之地,经《中国药房》杂志第一主办单位中国医院协会同意,并经重庆市文化委员会批准,决定自2015年1月起,将《中国药房》杂志由周刊改为

旬刊出版,即上旬刊为“药房与药事”、中旬刊为“药房与临床”、下旬刊为“药房与基本药物”,每期页码由96页增至144页,每期定价为15元、全年价540元。邮发代号:78-33。

本刊社