

毛冬青甲素对糖尿病肾病大鼠肾小球保护作用实验研究

陈辉¹, 孙锋², 邵跃斌¹

1. 广州市红十字会医院(暨南大学医学院第四附属医院), 广东 广州 510220

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 研究毛冬青甲素对糖尿病肾病大鼠模型的肾小球纤维化的影响, 探讨毛冬青甲素抗肾小球纤维化的作用机制。方法: 大鼠 48 只随机分为治疗组和对照组。建立链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病大鼠模型后, 治疗组: 腹腔注射毛冬青甲素 40 mg/kg; 对照组: 腹腔注射生理盐水 0.5 mL。0 天、7 天、14 天、28 天分别处死, 各组取 6 只大鼠。免疫组织化学法测定 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) 的表达。结果: 2 组大鼠的收缩压在 14 天、28 天比较, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 治疗组在第 7、14、28 天的血肌酐、血尿素氮、24 h 尿白蛋白均低于对照组, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。在第 7、14、28 天治疗组和对照组的 MCP-1 表达均差异显著 ($P < 0.01$); 治疗组第 7、14、28 天的 α -SMA 表达均低于对照组, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。结论: 毛冬青甲素可通过降低 α -SMA、MCP-1, 抑制单核/巨噬细胞浸润和系膜细胞增生, 减轻肾小球纤维化。

[关键词] 糖尿病肾病 (DN); 纤维化; 毛冬青甲素; 动物实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 01-0171-04

Experimental Study of Ilexonin A in Preventing Renal Glomerulus of Diabetic Nephropathy Rats

CHEN Hui, SUN Feng, SHAO Yuebin

Abstract: Objective: To investigate the effect of ilexonin A on the fibrosis of renal glomerulus of STZ-induced diabetic nephropathy rats, and to explore its possible mechanism of anti-renal-fibrosis. Methods: Forty-eight male Wistar rats were randomized into control group and ilexonin A group. Six rats of each group were killed respectively on day 0, 7, 14, 28 after the establishment of STZ-induced diabetic nephropathy model. Immunohistochemistry was performed to measure the expression levels of α -smooth muscle actin(α -SMA) and monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1). Results: On day 14 and 28, the difference of systolic pressure was significant between the two groups ($P < 0.01$). The contents of serum creatinine, blood urea nitrogen and urinary albumin as well as the expression levels of α -SMA and MCP-1 in ilexonin A group were lower than those in the control group on day 7, 14, and 28 ($P < 0.01$). Conclusion: Ilexonin A can inhibit renal fibrosis by decreasing the expression levels of α -SMA and MCP-1, and by relieving monocyte/macrophage infiltration and mesangial cell proliferation.

Keywords: Diabetic nephropathy; Fibrosis; Ilexonin A; Animal experiment

糖尿病肾病(DN)在世界上很多国家是终末期肾脏疾病(ESRD)的首位病因。DN 的主要临床表现为蛋白

尿, 从早期的微量白蛋白尿到大量蛋白尿, 最终进展至终末期肾脏疾病, 必须进行肾脏替代治疗以维持生

[收稿日期] 2013-08-26

[作者简介] 陈辉 (1977-), 女, 主治医师, 主要从事肾脏疾病的中西医结合治疗工作。

命。因此对于DN的早期防治、延缓肾功能的恶化具有重要意义,但目前尚没有特效的减轻DN蛋白尿、延缓其肾功能恶化的治疗手段。毛冬青是我国南方常用中药,目前研究主要集中在心血管、脑组织保护、抗炎、免疫等方面,在肾脏方面的研究不多,因考虑毛冬青具有降压、抗凝,对脑组织缺血、缺氧损伤的保护,抗炎、调节免疫等多方面的作用,故提示毛冬青在DN抗炎、减少尿蛋白等方面具有应用前景^[1]。本研究旨在通过毛冬青甲素对DN大鼠的实验研究,探讨毛冬青甲素对肾小球的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与施加因素 将雄性7周龄Wistar大鼠48只,随机分为治疗组和对照组,各24只。治疗组:每天给予腹腔注射毛冬青甲素40 mg/kg[注射用毛冬青甲素注射液购自广东省博罗先锋药业(40 mg/2 mL),产品批准文号:国药准字Z44023366,产品批号:090101];对照组:每天给予腹腔注射生理盐水0.5 mL;连续7天,每天1次,第7天给药1 h后进行造模手术。所有大鼠建立1型糖尿病肾病模型,给予一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司生产)65 mg/kg。在建模当天(d0)和建模后第7、14、28天每组随机选取6只大鼠处死取样。

1.2 血、尿标本的收集及检测 治疗组和对照组大鼠处死前吸入乙醚麻醉后抽取腹主动脉血液,后离心取上清液,测量血清肌酐和尿素氮,观察各组的肾功能情况,使用全自动生化分析仪(Olympus AU640,日本)检测血清肌酐和尿素氮。在建模当天(d0)和建模后第7、14、28天用代谢笼收集24 h尿液,记录尿量,3 000 r/min离心15 min,取上清用考马斯亮兰法测OD值,计算24 h尿蛋白含量。

1.3 肾组织切片免疫组化的研究

1.3.1 制备肾组织切片 将用10%福尔马林液体固定的DN大鼠的肾标本经脱水、包埋,做成组织蜡块,切成4 μm厚的切片。4 μm厚石蜡片用于免疫组织化学染色。

1.3.2 免疫组织化学法检测 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达采用SP法,具体操作步骤参见产品说明书。

1.3.3 结果分析 MCP-1和α-SMA的表达:在每张切片包含肾小球区域随机选取15个高倍镜视野(×200,HPF),用HM IAS22000高清晰彩色病理图文报告分析系统对所选取视野中免疫组化阳性信号进行图像分析,计算每个视野中阳性染色面积占总视野面积的百分比,并计算其均值(即平均面密度)。

1.4 统计学方法 采用SPSS18.0统计软件,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较用 t 检验,多组间比较用方差分析,其中两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 2组大鼠体重、血压、肾功能、24 h尿蛋白比较 见表1。2组大鼠在建模当天的体重、血压、肾功能、24 h尿蛋白比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$),有可比性。在第7、14、28天,2组大鼠的体重比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$);2组大鼠的收缩压比较,在14天、28天比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);2组大鼠舒张压比较,差异无显著性意义($P > 0.05$);治疗组在第7、14、28天的血肌酐、血尿素氮、24 h尿蛋白均低于对照组,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。

2.2 2组大鼠MCP-1、α-SMA比较 见表2,图1,图2。在建模当天的肾小球中2组均只有极少量的MCP-1表达,STZ造模后肾小球中MCP-1表达有明显增加,于造模后第14天达到较高水平,治疗

表1 2组大鼠体重、血压、肾功能、24 h尿蛋白比较($\bar{x} \pm s$)

项目	d0		d7		d14		d28	
	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组
体重(g)	170.25±5.8	172.92±6.7	174.67±7.7	176.50±5.4	199.67±6.8	205.50±7.6	252.83±18.8	274.00±19.4
收缩压(mmHg)	121.37±11.6	120.81±12.0	122.67±14.3	132.33±10.4	119.67±14.4 ^①	138.50±17.3	118.17±13.7 ^①	139.67±15.8
舒张压(mmHg)	66.28±13.2	67.76±12.5	65.00±11.0	69.17±15.4	64.50±24.8	68.67±11.4	57.83±16.1	70.00±20.4
血肌酐(μmol/L)	44.03±6.5	45.95±7.6	52.39±5.0 ^①	70.34±5.9	54.48±0.2 ^①	73.35±0.1	56.35±0.1 ^①	75.42±0.1
血尿素氮(mmol/L)	6.71±1.2	6.78±1.5	19.38±4.0 ^①	32.18±2.3	19.75±6.7 ^①	38.85±2.1	18.55±2.6 ^①	39.65±2.0
24 h尿蛋白(mg)	0.13±0.01	0.14±0.03	0.65±0.07 ^①	1.27±0.11	0.70±0.09 ^①	1.45±0.21	0.72±0.08 ^①	1.56±0.23

与对照组同期比较,① $P < 0.01$

组用药可明显抑制 MCP-1 表达, 在第 7、14、28 天治疗组和对照组的 MCP-1 表达均差异显著 ($P < 0.01$); 在建模当天的肾小球中 α -SMA 几乎无表达, STZ 造模后肾小球中出现明显的 α -SMA 表达, 于

造模后第 7 天更为明显, 治疗组第 7、14、28 天的 α -SMA 表达均低于对照组, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。

表 2 2 组大鼠 MCP-1、 α -SMA 比较($\bar{x} \pm s$)

项 目	d0		d7		d14		d28		%
	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组	
MCP-1	1.85± 0.08	1.72± 0.05	12.44± 0.22 ^①	19.86± 5.92	13.87± 0.92 ^①	30.34± 2.09	16.03± 0.84 ^①	26.45± 3.48	
α -SMA	0.57± 0.05	0.49± 0.07	4.69± 0.85 ^①	16.65± 7.20	5.17± 0.62 ^①	14.60± 2.30	2.66± 0.34 ^①	8.22± 0.74	

与对照组同期比较, ① $P < 0.01$

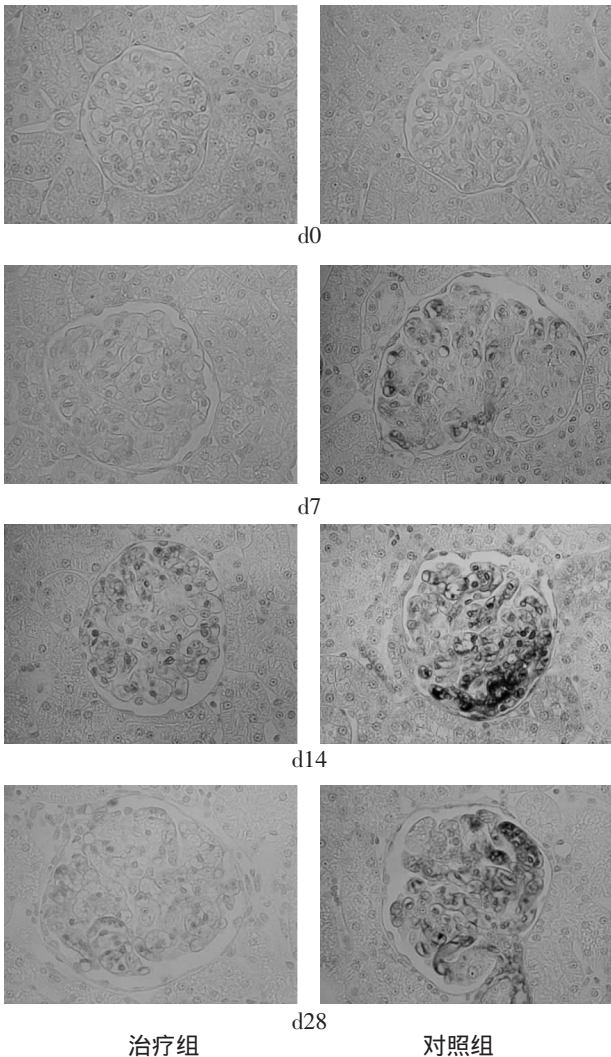


图 1 2 组大鼠 MCP-1 比较

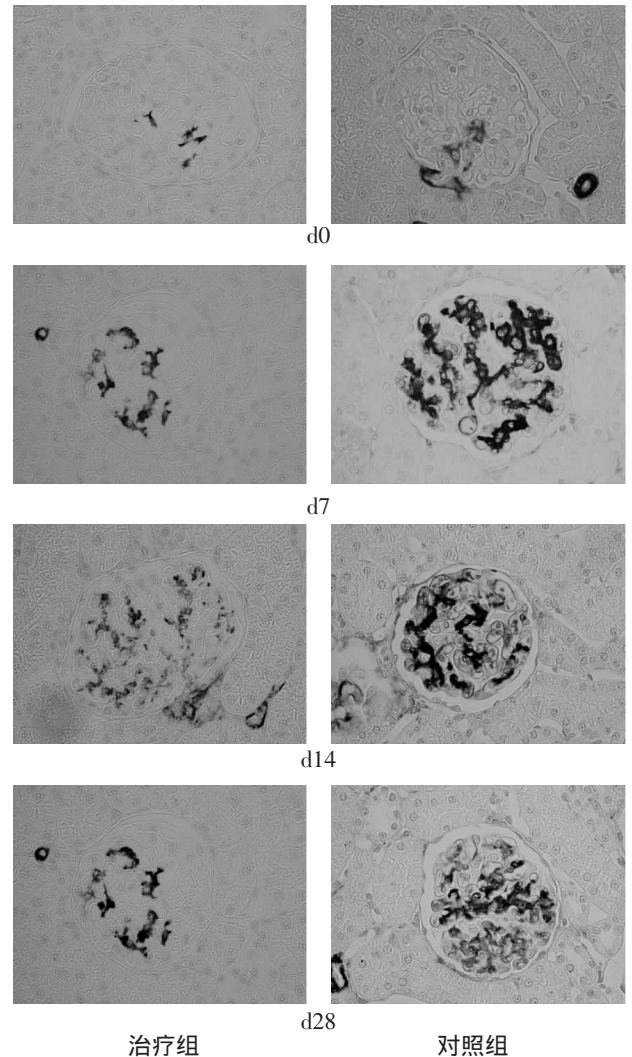


图 2 2 组大鼠 α -SMA 比较

3 讨论

毛冬青主要化学成分为五环三萜酸及其皂苷、简单酚性化合物及其苷类、环烯醚萜类化合物、木质素苷类, 并含有香豆素类、糖类及氨基酸等多种化学成分^[2-4]。三萜皂苷类成分是毛冬青的主要活性成分,

目前对其生物活性的研究主要体现在研究毛冬青甲素方面。毛冬青甲素是从毛冬青中提取的有效单体毛冬青酸(ilexolic acid)经琥珀酸酐酰化制得的一种具有生理活性的三萜化合物。梁小波等^[5]在用毛冬青甲素治疗慢性肾功能不全 50 例疗效观察中发现, 毛冬青中

提取物五环三萜类化合物,是新的血小板聚集抑制剂,具有明显抗血栓形成作用,所含黄酮苷有增加肾小球毛细血管血运的作用,改善肾组织缺血状态,从而增加肾小球滤过率,延缓慢性肾衰竭的进展。林诗书等^[6]用毛冬青甲素治疗小儿原发性高粘血症观察到,毛冬青甲素有明显改善血液黏滞度,提高原发性肾病综合征的疗效和防止重要脏器血栓形成的作用。赵利华等^[7]研究认为毛冬青甲素可以保护血管内膜,降低血管内膜损伤后再狭窄,减少血管内膜损伤后炎症反应。刘小玉等^[8]在探讨毛冬青甲素对输卵管炎阻塞的防治作用中发现,毛冬青甲素能抑制输卵管炎所致的结缔组织增生,对抗黏膜上皮的变性坏死,抑制炎症浸润,用药组与对照组比较,差异有显著性意义。许爱玲等^[9]观察毛冬青甲素对大鼠脑缺血再灌注后神经功能缺损和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)蛋白表达的影响,认为毛冬青甲素的神经保护机制可能与促进大鼠脑缺血再灌注损伤周边组织 bFGF 蛋白的表达有关。

MCP-1 是特异性的单核 / 巨噬细胞趋化因子,在进行性的器官纤维化中起重要作用, MCP-1 可能通过介导单核 / 巨噬细胞浸润参与肾间质纤维化。MCP-1 还可以以时间和剂量依赖的方式,使肾小球上皮细胞白细胞介素-6(IL-6)增多,而 IL-6 是一种具有刺激系膜细胞增殖作用的细胞因子,提示 MCP-1 有直接促肾小球纤维化的作用。肾小球纤维化与单核 / 巨噬细胞的聚集高度相关,它通过分泌转化生长因子、血小板衍生生长因子、IL-6、碱性成纤维细胞生长因子等细胞因子和促增殖因子直接促进固有的成纤维细胞增殖活化,促进细胞外基质合成增多,抑制细胞外基质降解,导致肾小球纤维化。在本实验中,结果显示 STZ 造模后对照组的 MCP-1 表达显著增强,而毛冬青甲素治疗能抑制各个研究时间点 MCP-1 的表达。提示毛冬青甲素能减轻肾小球的炎症反应。

α -SMA 被认为是肌成纤维细胞的特异性标志物。肌成纤维细胞具有纤维细胞和平滑肌细胞的共同特性,它在创伤收缩和愈合过程中发挥重要的作用,并且,肌成纤维细胞参与了组织纤维化和瘢痕形成发

病机制。肌成纤维细胞在肾脏瘢痕形成中具有重要作用,它能活化产生细胞外基质的分子成分如 I、II 型胶原。 α -SMA 的表达是进展性间质纤维化过程中的一个非常重要的事件。STZ 模型中肾内固有细胞损伤活化及浸润的炎症细胞都可分泌多种可溶性生物活性物质,这些活性物质又通过旁分泌及自分泌进一步刺激相关细胞增殖,分泌大量的多种基质成分,导致肾脏纤维化。本研究显示,STZ 造模后对照组的 α -SMA 的表达大幅增强,说明 STZ 造模成功诱导出了肾小球的纤维化,而毛冬青甲素同样能抑制 α -SMA 的表达。提示毛冬青甲素能减轻肾小球 α -SMA 的表达从而起到抗纤维化的作用。

毛冬青甲素可通过降低 α -SMA 和 MCP-1 表达,抑制单核 / 巨噬细胞浸润和系膜细胞增生,减轻肾小球纤维化,从而具有很好的肾保护作用。

[参考文献]

- [1] 李向荣. 毛冬青药理作用研究概述[J]. 环球中医药, 2011, 4(3): 238-240.
- [2] 杨鑫. 华山松松塔和毛冬青化学成分及生物活性的研究[D]. 南京: 江南大学, 2005.
- [3] 杨鑫, 丁怡, 张东明. 毛冬青中木质素苷类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007(13): 1303-1305.
- [4] 周中流. 毛冬青化学成分的研究[D]. 南宁: 广西师范大学, 2007.
- [5] 梁小波, 曹聪, 张伟君. 毛冬青甲素配合中药大黄灌肠治疗慢性肾衰竭临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(9): 827-828.
- [6] 林诗书, 宋国雄, 谢瑞珍, 等. 毛冬青甲素治疗小儿原发性肾病高粘血症[J]. 广东医药, 1993(3): 9.
- [7] 赵利华, 李章伟, 杨闯, 等. 毛冬青甲素对兔颈总动脉球囊损伤后炎症因子 IL-6 和 M-CSF 的影响[J]. 吉林大学学报, 2008(1): 105-107.
- [8] 刘小玉, 李丽芸, 张淑明, 等. 毛冬青甲素对大鼠实验性输卵管炎性阻塞的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1993(8): 478.
- [9] 许爱玲, 郑毅. 毛冬青甲素对大鼠脑缺血再灌注后 bFGF 表达的影响[J]. 福建中医药, 2012, 43(2): 38-39.

(责任编辑: 马力)