

黄芩素对阿霉素肾病大鼠肾小管上皮细胞凋亡的调节作用*

吴嘉 易铁钢#

(广州中医药大学深圳附属医院肾病科 广东深圳 518033)

摘要:目的:探讨黄芩素对阿霉素肾病大鼠肾小管上皮细胞凋亡的调节作用。方法:18 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(正常组, $n=6$)、阿霉素肾病组(模型组, $n=6$)和黄芩素治疗组(治疗组, $n=6$),模型组和治疗组一次性尾静脉注射阿霉素 2.0 mg/kg 诱导阿霉素肾病动物模型,正常组注射等量生理盐水。造模后第 1 天开始,治疗组予黄芩素 300 mg/(kg·d)灌胃,正常组和模型组予等量蒸馏水灌胃,共治疗 8 周。8 周时留取各组大鼠 24 h 尿液标本及肾脏组织标本,使用 TUNEL 检测肾小管上皮细胞凋亡,免疫组化检测肾组织中 caspase-3 表达,western Blot 方法检测肾皮质中 Bcl-2 及 caspase-3 蛋白水平。结果:与正常组比较,模型组 24 h 尿蛋白定量明显升高($P<0.05$),肾小管上皮细胞凋亡数量明显增加($P<0.05$),肾皮质中 caspase-3 蛋白水平明显增加($P<0.05$),Bcl-2 蛋白水平明显下降($P<0.05$)。与模型组比较,治疗组 24 h 尿蛋白定量明显下降($P<0.05$),TUNEL 阳性肾小管上皮细胞数量明显减少($P<0.05$),肾皮质中 caspase-3 蛋白水平明显下降($P<0.05$),Bcl-2 蛋白水平明显增加($P<0.05$)。结论:黄芩素对阿霉素肾病具有一定的保护作用,其作用机制可能与调节肾小管上皮细胞凋亡有关。

关键词:阿霉素肾病;黄芩素;肾小管上皮细胞凋亡;caspase-3;Bcl-2

中图分类号:R692

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.04.044

阿霉素肾病 (Adriamycin Nephropathy, AN) 动物模型最早由 Bertani 等于 1982 年制作成功。其临床特点为大量蛋白尿,病理特点类似微小病变,早期仅表现为电镜下足突融合,后期逐渐出现肾小球硬化及肾小管间质纤维化^[1]。作为典型的足细胞损伤模型,许多因素参与 AN 发生发展^[2],其中肾小管上皮细胞 (Tubular Epithelial Cells, TECs) 凋亡是导致肾小管损伤进而走向小管间质纤维化的重要因素^[3]。中药单体黄芩素具有调节细胞凋亡和肾脏保护作用^[4-5]。本研究拟从 TECs 凋亡角度探讨黄芩素对 AN 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 18 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 170~220 g, 购自南方医科大学实验动物中心, 适应性喂养 1 周, 实验期间自由饮水、摄食。

1.1.2 实验用药、试剂及主要仪器 阿霉素 (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), 黄芩素 (南京崇原生物有限公司), Bcl-2 一抗 (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), western blot 浓度为 1 : 500, caspase-3 一抗 (Abcam, Cambridge, UK), western blot 浓度为 1 : 200, 免疫组化浓度为 1 : 20, 二抗 (Cell signaling Tec, MA, USA), 免疫组化试剂盒 (Maixin-Bio, Fuzhou, China), TUNEL 检测试剂盒 (德国 Merck), 大鼠代谢笼 (Tecniplast S.p.a, Buguggiate, Italy), 荧光显微镜 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan), 垂直电

泳仪 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 转膜仪 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 罗氏全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作及干预 将 18 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组 ($n=6$)、模型组 ($n=6$) 和治疗组 ($n=6$), 模型组和治疗组一次性尾静脉注射阿霉素 2.0 mg/kg, 正常组注射等量生理盐水。造模后第 1 天开始, 治疗组予黄芩素 300 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组予等量蒸馏水灌胃, 共治疗 8 周。

1.2.2 标本采集与保存 治疗 8 周后, 使用大鼠代谢笼收集各组 24 h 尿液标本。肾脏组织标本采集步骤如下: 10% 水合氯醛按 35 mg/100 g 腹腔注射麻醉, 沿腹正中线剖开腹腔, 摘除肾脏, 切取一半左肾用 10% 福尔马林固定, 经脱水, 透明, 石蜡包埋, 切片 4 μ m, 行 TUNEL 及检测免疫组织化学染色。剩余肾脏组织分离皮髓质后冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 以备 Western Blot 检测。

1.2.3 标本测定 24 h 尿蛋白定量 (免疫比浊法), 使用罗氏全自动生化分析仪。使用 TUNEL 检测 TECs 凋亡, 免疫组化检测肾皮质中 caspase-3 表达分布, Western blot 方法检测肾皮质中 caspase-3 及 Bcl-2 蛋白水平。

1.3 统计学处理 计量资料用算术均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组以上均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较应用最小极差分析, 使用 SPSS16.0

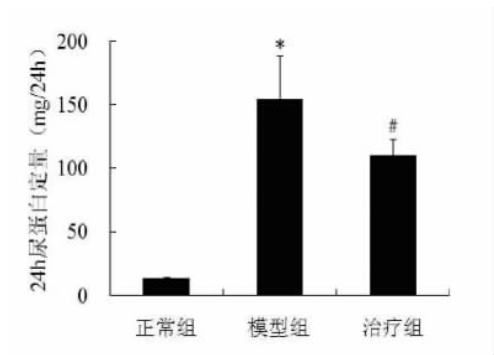
* 基金项目: 广东省自然科学基金 (编号: 2015A030313883);
广东省深圳市科技计划项目 (编号: JCYJ20140408152909284, JCYJ20150401163247228);
广东省深圳市卫生计生系统科研项目 (编号: 201402079)

通讯作者: 易铁钢, E-mail: KOKYO_82@163.COM

统计软件处理, $P<0.05$ 为有显著性差异。TUNEL 计数方法: 每个样本随机选取 5 个高倍镜下视野 (HPF, $40\times$ 物镜), 每个视野计数 TUNEL 阳性 TECs 个数, 计算其平均值。免疫组化图片采集使用 $20\times$ 物镜下视野。Western Blot 结果以 β -actin 作为内参进行比较, 使用 Bio-Rad 全能成像仪 (Bio-Rad Laboratories, California, USA) 进行统计分析。

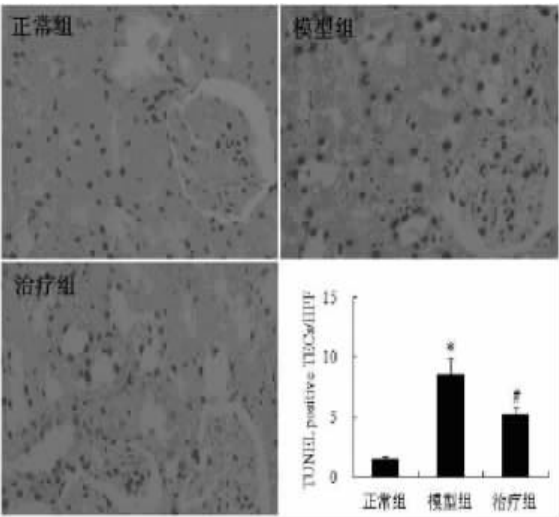
2 结果

2.1 24 h 尿蛋白定量 与正常组比较, 模型组 24 h 尿蛋白定量明显升高 ($P<0.05$), 治疗组经黄芩素干预 8 周后明显下降 ($P<0.05$)。见图 1。



注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。
图 1 各组大鼠第 8 周时 24h 尿蛋白定量

2.2 TUNEL 阳性 TECs 数量 与正常组比较, 模型组 TUNEL 阳性 TECs 数量明显增加 ($P<0.05$), 治疗组较模型组明显减少 ($P<0.05$)。见图 2。



注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。
图 2 各组大鼠 8 周时高倍镜视野下 TECs 凋亡计数

2.3 肾组织中 caspase-3 表达分布 免疫组化染色结果显示肾组织中 caspase-3 表达分布主要集中在肾小管, 肾小球中也有少量表达, 与 TUNEL 检测结果基本一致。见图 3。

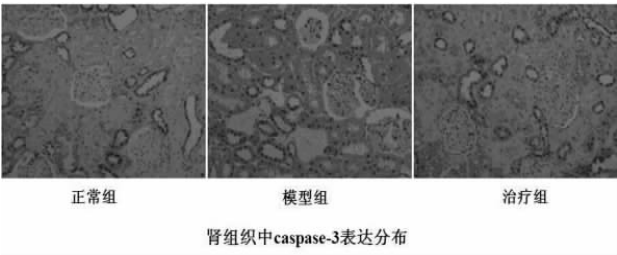
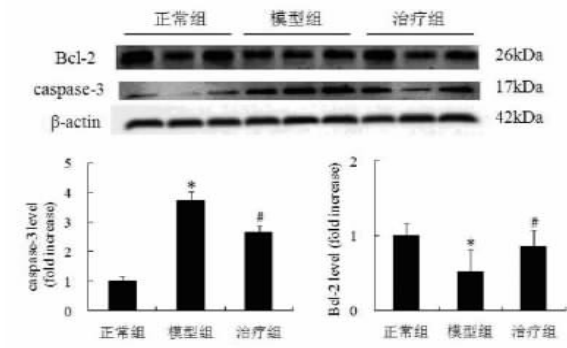


图 3 各组大鼠 8 周时肾组织 caspase-3 免疫组化染色

2.4 肾皮质中 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白水平 Western blot 结果显示与正常组比较, 模型组肾皮质中 caspase-3 蛋白水平明显增加 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白水平明显下降 ($P<0.05$), 与模型组比较, 治疗组肾皮质中 caspase-3 蛋白水平明显下降 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白水平明显增加 ($P<0.05$)。见图 4。



注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。
图 4 8 周时各组大鼠肾皮质 caspase-3 及 bcl-2 蛋白水平

3 讨论

细胞凋亡是细胞在一定信号刺激下出现的自主性、程序性细胞死亡, 其过程受到严格的基因调控, 在正常生理过程或病理条件下均可发生, 是机体维持细胞数量平衡和清除异常及危险细胞的重要机制^[6]。TECs 凋亡在缺血性肾损伤、药物性肾损害、梗阻性肾脏病中均起到重要作用。慢性肾病状态下, 持续蛋白尿所致 TECs 凋亡与小管萎缩程度及肾功能损害呈明显正相关^[7]。作为细胞凋亡的重要调节蛋白, caspase-3 与 Bcl-2 的表达与 TECs 凋亡密切相关^[8]。AN 进展至 8 周时, TUNEL 检测结果显示模型组大鼠 TECs 凋亡数量明显增加, 这表明 TECs 凋亡参与了 AN 肾病的进展。免疫组化染色显示 caspase-3 主要分布于肾小管, 肾小球中仅有少量表达, 与 TUNEL 检测结果基本一致。肾皮质中 caspase-3 蛋白水平表达上调则进一步证实了肾组织中细胞凋亡的发生。肾皮质中 Bcl-2 蛋白水平表达下调则提示线粒体凋亡通路可能参与到 TECs 细胞凋亡进程。经黄(下转第 94 页)

[13]Utsumiya M,Koide T,Yamaguchi S,et al.The effect of kampou medicine on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro[J].Hinykika Kiyo,1991,37(10):1097-1101

[14]Koide T,Yamaguchi S,Utsunomiya M,et al.The inhibitory effect of kampou extracts on in vitro calcium oxalate crystallization and in vivo stone formation in an animal model [J].Int J Urol,1995,2(2): 81-86

[15]肖劲逐,李浩勇,张国庆,等.夏枯草提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的影响[J].中国现代医学杂志,2008,18(11):1486-1489

[16]肖劲逐,李浩勇,张国庆,等.夏枯草提取物对肾草酸钙结石模型大鼠肾组织骨桥蛋白表达的影响[J].中国现代医学杂志,2008,18(8): 1013-1017

[17]田代华.实用中医对药方[M].北京:人民卫生出版社,2000.213

[18]宋强,吴希庆,萨音白刚.金钱草总黄酮预防草酸钙肾结石的实验研究[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(18):38-39

[19]Hirayama H,Wang Z,Nishi K,et al.Effect of Desmodium styracifolium-triterpenoid on calcium oxalate renal stones [J].Br J Urol,1993,71(2):143-147

[20]李静,胡国全,桂敬强,等.金钱草水提液对小鼠肾脏草酸钙结石形成的干预作用[J].安徽科技学院学报,2014,28(2):5-11

[21]李静,梁圆,李立顺,等.金钱草不同部分对草酸钙结石小鼠肾脏骨桥蛋白表达的影响[J].安徽科技学院学报,2015,29(2):1-5

[22]李静,贺绍君,赵书景,等.金钱草对草酸钙结石小鼠红、白细胞数的影响[J].赤峰学院学报(自然科学版),2012,28(17):151-153

[23]Zhang LH,Yin ZQ,Ye WC.Flavonoids from *Lygodium japonicum* [J].Biochemical Systematics & Ecology,2006,34(12):885-886

[24]Zhang LH,Fan CL,Zhang XT,et al.A new steroidal glycoside from *Lygodium japonicum* [J]. Journal of China Pharmaceutical University,2006,37(6):491-493

[25]Ye WC,Fan CL,Zhang LH,et al.A new phenolic glycoside from the roots of *Lygodium japonicum*[J].Fitoterapia,2007,78(7-8):600-601

[26]王润霞,王秀芳,谢安建,等.海金沙提取液抑制草酸钙结石的化学基础研究[J].通化师范学院学报,2010,31(4):1-4,8

[27]Cho HJ,Bae WJ,Kim SJ,et al.The inhibitory effect of an ethanol extract of the spores of *Lygodium japonicum* on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats [J].Urolithiasis,2014,42 (4): 309-315

[28]Zhao YY.Traditional uses,phytochemistry,pharmacology, pharmacokinetics and quality control of *Polyporus umbellatus*(Pers.) Fries:a review[J].J Ethnopharmacol ,2013,149(1):35-48

[29]王平,刘诗倭.猪苓提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的抑制作用 [J].中国临床康复,2006,10(43):73-75

[30]梁学清,李丹丹,黄忠威.茯苓药理作用研究进展[J].河南科技大学学报(医学版),2012,30(2):154-156

[31]陈焱,刘春晓,张积仁.茯苓多糖防石作用的实验研究[J].中华泌尿外科杂志,1999,20(2):114-115

[32]张石生,刘国栋,何家扬,等.胖大海抑制草酸钙结晶形成的实验结果与临床观察[J].中华泌尿外科杂志,1996,17(1):51-53

[33]王润霞,王秀芳,沈玉华,等.胖大海提取液阻断草酸钙结石形成的实验研究[J].巢湖学院学报,2014,16(3):63-67,81

[34]王润霞,谢安建,李士阔,等.玉米须提取液对尿液中草酸钙结晶体形成的影响[J].无机化学学报,2009,25(10):1711-1716

[35]蔡华芳,罗砚曦,蒋幼芳,等.肾茶提取物抑制小鼠草酸钙结石作用研究[J].中国实用医药,2008,3(7):1-2

[36]黄幼霞,黄荣桂,郑兴中.迷迭香酸对大鼠肾草酸钙结石形成的影响[J].中国医院药学杂志,2011,31(14):1196-1199

[37]Zhong YS,Yu CH,Ying HZ,et al.Prophylactic effects of *Orthosiphon stamineus* Benth extracts on experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in rats [J].J Ethnopharmacol,2012,144 (3): 761-767

[38]Poonguzhali PK,Chegu H.The influence of banana stem extract on urinary risk factors for stones in normal and hyperoxaluric rats[J].Br J Urol,1994,74(1):23-25

[39]李山,吴闯,农华,等.芭蕉芯及维生素 B₆ 对小鼠肾草酸钙结晶抑制作用的研究[J].中华外科杂志,1998,36(12):763-765

(收稿日期: 2015-11-10)

(上接第 82 页) 苓素干预 8 周后, 治疗组 24 h 尿蛋白定量明显下降, 表明黄苓素对 AN 有一定的保护作用。治疗组 TECs 凋亡减少, caspase-3 蛋白水平下调, Bcl-2 蛋白水平上调, 提示黄苓素可能通过 Bcl-2、caspase-3 起到调节细胞凋亡的作用, 但其具体的作用机制尚需进一步探讨。综上所述, 本研究初步证实了黄苓素对 AN 具有一定的保护作用, 其作用机制可能与调节 TECs 凋亡有关。

参考文献

[1]Bertani T,Poggi A,Pozzoni R,et al.Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events [J].Lab Invest, 1982,46(1):16-23

[2]Lee VW,Harris DC.Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis [J].Nephrology (Carlton),2011,16(1): 30-38

[3]Ohse T,Inagi R,Tanaka T,et al.Albumin induces endoplasmic

reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells [J]. Kidney Int,2006,70(8):1447-1455

[4]Lin M,Li L,Li L,et al.The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis[J].BMC Complement Altern Med,2014,14(1):1-9

[5]Lee EK,Kim JM,Choi J,et al.Modulation of NF- κ B and FOXOs by baicalein attenuates the radiation-induced inflammatory process in mouse kidney[J].Free Radic Res,2011,45(5):507-517

[6]Favaloro B,Allocati N,Graziano V,et al.Role of apoptosis in disease [J].Aging (Albany NY),2012,4(5):330-349

[7]Erkan E,Garcia CD,Patterson LT,et al.Induction of renal tubular cell apoptosis in focal segmental glomerulosclerosis: roles of proteinuria and Fas-dependent pathways [J].J Am Soc Nephrol,2005,16 (2): 398-407

[8]Czabotar PE,Lessene G,Strasser A,et al.Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2014,15(1):49-63

(收稿日期: 2016-03-18)