

溶石颗粒剂对结石模型大鼠肾骨桥蛋白 mRNA表达的影响

黄萍¹, 黄卫华¹, 孔繁智¹, 楼宜嘉² (1. 浙江省立同德医院, 杭州 310012; 2. 浙江大学药学院, 杭州 310031)

摘要:目的 通过测定用药前后肾脏骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) mRNA含量的变化, 阐明民间验方溶石颗粒剂治疗肾结石的作用机制。方法 采用乙二醇-氯化铵法致大鼠肾结石, 同时每天一次 ig 给予溶石颗粒剂 5.8, 11.6, 17.4 g·kg⁻¹, 实验全程 21 d。每 7 d 做以下测定: 血标本测定尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、钙和磷含量; 尿标本以 EDTA 法测定钙含量, 比色法测定草酸含量; 肾组织 HE 染色, 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术检测大鼠肾骨桥蛋白 mRNA 的表达。结果 模型组大鼠肾 OPN mRNA 的表达明显增加, 与溶剂对照组相比 ($P < 0.01$), 其中 21 d 模型组 OPN mRNA 的表达最高, 为溶剂对照组的 4 倍; 溶石颗粒剂各剂量组均能明显抑制大鼠肾结石模型 OPN mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 且呈现明显的量效关系; 溶石颗粒剂各剂量组能减轻大鼠肾脏草酸钙结晶程度, 显著降低大鼠尿钙和草酸含量 ($P < 0.01$)。结论 溶石颗粒剂可以抑制大鼠肾结石模型中 OPN mRNA 的表达。

关键词: 溶石颗粒剂; 肾结石; 骨桥蛋白 mRNA; 草酸钙

中图分类号: R965.1; R289 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)06-0448-05

Effect of Rongshi Granules on Renal Stone Formation and Osteopontin mRNA Expression in a Rat Urolithiasis Model

HUANG Ping¹, HUANG Wei-hua¹, KONG Fan-zhi¹, LOU Yi-jia² (1. Tong-De Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2. Department of Pharmacology, Pharmacy College, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

基金项目: 浙江省分析测试基金 (04032)

作者简介: 黄萍, 女, 副主任药师, 药理学硕士

Tel: (0571) 89972233

E-mail: huangpwly@sina.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Rongshi Granules on osteopontin(OPN) mRNA expression. **METHODS** The stone group rats were administered with ethylene glycol (EG) and ammonium chloride, The control group rats were non-treated; and the Rongshi Granule groups (low-dose, medium-dose and high-dose groups) were administered with Rongshi Granule in addition to EG and ammonium chloride in 21 days. Pooled 24-hour urine samples from each group were collected weekly by the use of metabolic cages, the concentration of uric calcium and oxalic acid were respectively measured by EDTA and photoelectric colorimetric method. Eight animals from each group were killed at 0, 7, 14, and 21 days, kidney was used for histologic examination and the expression of osteopontin mRNA was analyzed with RT-PCR technology. **RESULTS** The expression of kidney osteopontin mRNA in model group was obviously higher than that of in solvent control group ($P < 0.01$), and was the highest at 21 days, and 4 times as that of in control. The expression of kidney osteopontin mRNA in all of the Rongshi Granule groups was lower than that of in model group ($P < 0.05$), with an obvious dose-dependent manner. The crystallization degree of the kidney calcium oxalate of the rats in all the Rongshi Granule groups was much lower than that of model group, and the uric calcium and oxalic acid of all the Rongshi Granule groups were much lower than that of model group ($P < 0.01$). **CONCLUSION** The Rongshi Granules could inhibit the expression of osteopontin mRNA in a rat urolithiasis model.

KEY WORDS: Rongshi Granule; renal stone; osteopontin mRNA; calcium oxalate

溶石颗粒剂以祖国医学理论为指导,根据民间治疗泌尿系结石验方组成^[1-2]。溶石颗粒剂由连钱草、海金沙、延胡索、三七、莪术、地龙、鸡内金等药味组成。该组方具有确切的临床疗效。本课题的以往研究表明溶石颗粒剂对乙酰胆碱所致大鼠泌尿系结石具有明显的治疗和预防作用,且同时又有一定的抗炎、镇痛、利尿作用^[3-4]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是重要的尿大分子抑制物,是机体抵御结石形成的重要因素之一。我们测定了大鼠应用溶石颗粒剂前后肾脏 OPN mRNA 的表达和尿晶体成分的变化,旨在进一步阐明溶石颗粒剂治疗肾结石的作用机制,为溶石颗粒剂的推广应用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD大鼠,体重(200±20)g,♀♂,由浙江省中医药研究院动物房提供,清洁级,合格证号:医动字第220810017号。

1.2 实验环境

实验均在清洁级动物实验室内进行,饮用水为消毒水。自由摄取食物和饮水,光照与黑暗为12h交替,室温为22~25℃,相对湿度60%。

1.3 药物与试剂

1.3.1 药物 溶石颗粒剂(浙江省立同德医院制剂室,批号:010625)。

1.3.2 主要试剂 总RNA抽提试剂(Trizol, Invitrogen公司)、焦磷酸二乙酯(DEPC)(华美公司)、75%乙醇(以DEPC处理水)、RT-PCR引物(博亚公司合成)、去离子甲酰胺(生工公司)、M-MLV逆转录酶(Promega公司)、Taq酶(博亚公司)、琼脂糖(华美公司)、溴酚蓝(北京鼎国公司)、溴化乙锭(北京鼎国公司)、DNA Marker(宝生物工程公司)、随机引物(宝生物工程有限公司)、RNA酶抑制剂(华美公司)、dNTP混合物(博亚公司)。

1.3.3 仪器与设备 基因扩增仪TC-96/T/H(a)型(杭州大和热磁电子有限公司)、Leica DMLB荧光显微摄影系统、凝胶成像系统GIS-2008型(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药方法

取健康SD大鼠104只,体重为(200±20)g,在代谢笼中适应环境7d后开始实验。随机分成13组,每组8只,雌雄各半,喂饲普通饲料,造肾结石模型方法为饮用含诱石剂 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二醇和 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化铵的自来水^[5-6]。设定溶石颗粒剂5.8、11.6、17.4 $\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(其中低剂量按照体表面积折算接近临床人用量),临用前将溶石颗粒剂分别配成0.58、1.16、1.74 $\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液,每日一次大鼠ig上述溶液1 mL/100g。第1、2、3组分别为一周溶石颗粒剂17.4、11.6、5.8 $\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,饮用诱石剂一周同时ig给予溶石颗粒剂高、中、低剂量;第4组为造模一周组,饮用诱石剂一周;第5、6、7组为二周溶石颗粒剂17.4、11.6、5.8 $\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,饮用诱石剂二周同时ig给予溶石颗粒剂高、中、低剂量;第8组为造模二周组,饮用诱石剂二周;第9、10、11为三周溶石颗粒剂17.4、11.6、5.8 $\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,饮用诱石剂三周同时ig给予溶石颗粒剂高、中、低剂量;第12组为造模三周组,饮用诱石剂三周;第13组为未处理组,饮用自来水,ig给予等量生理盐水。于用药第7、14、21天用代谢笼收集各组24h的尿,-70℃冻存。用EDTA法测尿钙的含量,比色法测定尿草酸含量。第7、14、21天,断颈处死前采血测定尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、钙和磷含量。

2.2 肾组织的固定、取材及切片

用 Olympus 光学显微镜观察十三个组别的常规 HE 切片。重点观察肾脏病理改变及草酸钙结晶情况。

2.5 RT-PCR法步骤

2.5.1 总 RNA 抽提 ①取冻存组织约 5 mg 置于玻璃匀浆器中,加 1 mL Trizol 匀浆 5 min 后,将匀浆液移至 1.5 mL Eppendorf 管,于冰上放置 10 min。②12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。③取上清,加 200 μL 氯仿,混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。④取上清,加 600 μL 氯仿,混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。⑤取上清,加等体积异丙醇,混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。⑥弃上清,用 75% 乙醇 1 mL 冲洗,高速离心 5 min。⑦弃上清, RNA 沉淀于空气中干燥。⑧将干燥后的 RNA 溶解于 DEPC 处理水中。⑨将总 RNA 作适当稀释后,分光光度计测 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值,并定量。定量公式: RNA 浓度 (μg·mL⁻¹) = A₂₆₀ × 40 × 稀释倍数。

2.5.2 RT-PCR 法步骤 ①取相同剂量组的 RNA (2 μg) 经 M-MLV 逆转录酶系统合成 cDNA 第一链,反应总体积 20 μL,按下列顺序加入反应物: 2 μg RNA 加 DEPC 处理水至 8 μL; RNA 酶抑制剂 0.5 μL (25 U); 随机引物 2 μL。阴性对照以不含 RNA 的 DEPC 水代替组织 RNA,其余全部相同。②在 65 ℃ 处理 5 min。室温放置 10 min,高速离心 5 s。③按下列顺序加入反应物: RNA 酶抑制剂 0.5 μL (25 U); 5 × 逆转录酶缓冲液 4 μL; dNTP 2 μL (20 mmol); DTT 2 μL; M-MLV 1 μL (200 U)。④37 ℃ 下反应 1 h,90 ℃ 处理 5 min,冰浴 5 min;高速离心 5 s。⑤PCR 扩增 cDNA,根据文献报道^[7],设计两段引物,上下游引物长度分别为 27 bp 和 24 bp: Upper Primer: OPN 的碱基序列 1 位至 27 位 5'-ATG AGA CTT

GCA GTG ATT TGC TTT TGC-3'; Lower Primer: OPN 的碱基序列 493 位至 516 位 5'-CTC ATC TGT GGC ATG GGG ATA CTG-3'。参照物 GAPDH,上下游引物长度均为 20 bp: Upper Primer: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; Lower Primer: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。50 μL 反应体系构成如下: 灭菌水 39.5 μL; 10 × Taq 酶缓冲液 5 μL; dNTP 1 μL (10 mmol); Upper Primer 1 μL (50 pmol); Lower Primer 1 μL (50 pmol); Template 2 μL; Taq 酶 0.6 μL (3 U)。扩增的条件为 a: 94 ℃ 2 min; b: 94 ℃ 30 s; c: 61 ℃ (OPN)、60 ℃ (GAPDH) 45 s; d: 72 ℃ 1 min; e: 72 ℃ 6 min; 其中 b、c、d 三个步骤持续 29 个循环。产物长度: 516 bp (OPN), 452 bp (GAPDH)。⑥取扩增产物 10 μL,上样于 1.5 % 琼脂糖凝胶 (内含 0.5 μg·mL⁻¹ 溴化乙锭),在 TBE 缓冲液中,电泳时间 30 min,电压 90 V。⑦凝胶成像系统观察电泳结果并照相,以 OPN 与 GAPDH 的净面积比值作为 OPN 的相对表达量。

2.6 统计学分析

全部数据采用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较采用 One-Way ANOVA。检查结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均以 $P < 0.05$ 为显著性。

3 结果

3.1 各组大鼠的血清生化结果

与溶剂对照组相比,尽管用乙二醇法诱导大鼠肾结石模型第三周,模型组、溶石颗粒剂 11.6、5.8 g·kg⁻¹ 组 BUN, Cr 有轻微升高,但大鼠肾功能的损害并不非常严重,说明结石的形成是渐进性的。与溶剂对照组相比,模型组、溶石颗粒剂各剂量组血清的 Ca 与 P 含量没有显著性差异 ($P > 0.05$),见表 1。

Tab 1 Effects of Rong Shi Granule on Cr creatinine, BUN blood urea nitrogen, Ca calcium, P phosphorus. Summary of serum values ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组 别	血清生化指标		血清 Ca 与 P 含量 /mmol·L ⁻¹		
		BUN/mm ol·L ⁻¹	Cr/μmol·L ⁻¹		
未处理组		7.03 ±0.64	61.88 ±13.43	2.36 ±0.13	2.66 ±0.52
一周溶石颗粒剂 (g·kg ⁻¹)	17.4	7.31 ±1.62	70.38 ±6.34	2.39 ±0.14	2.80 ±0.35
	11.6	6.70 ±1.76	62.38 ±6.67	2.37 ±0.17	2.62 ±0.30
	5.8	10.99 ±7.04			

表 2 大鼠 ig给予溶石颗粒剂对尿液中钙、草酸含量的影响 (n= 8 $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of Rong Shi Granule on the 24-hour urinary excretion of calcium and oxalate acid (n= 8 $\bar{x} \pm s$)

组 别		草酸含量	钙含量
		/mmol·L ⁻¹	/mmol·L ⁻¹
未处理组		0.97±0.16	1.77±0.17
一周溶石颗粒剂 /g·kg ⁻¹	17.4	2.93±0.54 ¹⁾	2.57±0.66 ¹⁾
	11.6	3.09±0.38 ¹⁾	3.66±0.77 ¹⁾
	5.8	3.28±0.36 ¹⁾	4.46±0.88 ¹⁾
造模一周组		3.33±1.06 ¹⁾	6.27±0.66 ¹⁾
二周溶石颗粒剂 /g·kg ⁻¹	17.4	3.06±0.47 ¹⁾	3.16±0.75 ¹⁾
	11.6	3.20±0.55 ¹⁾	4.21±0.69 ¹⁾
	5.8	3.56±0.54 ¹⁾	5.58±1.02 ¹⁾
造模二周组		3.72±0.56 ¹⁾	7.83±1.08 ¹⁾
三周溶石颗粒剂 /g·kg ⁻¹	17.4	3.12±0.44 ¹⁾	3.93±0.69 ¹⁾
	11.6	3.27±0.41 ¹⁾	5.39±0.89 ¹⁾
	5.8	3.48±0.36 ¹⁾	6.46±1.08 ¹⁾
造模三周组		4.07±0.44 ¹⁾	8.58±1.20 ¹⁾

注:与未处理组比较, ¹⁾P<0.01

Note ¹⁾P<0.01, vs solvent control group

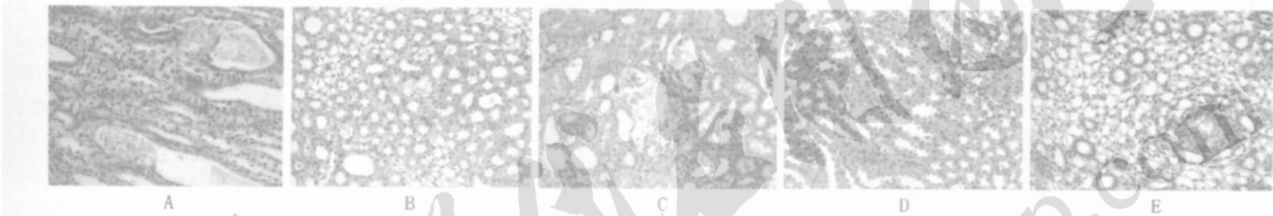


图 1 HE染色光学显微镜检测肾组织草酸钙沉积

A: 三周模型组, 可见较多透明不规则小块状的草酸钙结晶; B: 三周溶石冲剂 17.4 g·kg⁻¹组可见较少量透明的草酸钙结晶; C: 三周溶石冲剂 5.8 g·kg⁻¹组, 可见一定量局限透明的草酸钙结晶; D: 三周溶剂对照组, 未见草酸钙结晶; E: 三周溶石冲剂 11.6 g·kg⁻¹组, 可见少量透明的草酸钙结晶 (×200)

Fig 1 HE stain detected calcium oxalate deposition

Microscopic appearance of rat kidneys in the model groups (A), Rong Shi Granule 5.8 g·kg⁻¹ groups (C), Rong Shi Granule 11.6 g·kg⁻¹ groups (E), Rong Shi Granule 17.4 g·kg⁻¹ groups (B) and control groups (D) at day 21 of treatment (×200)

4 讨论

OPN 是带负电荷的糖基化磷蛋白, 含有 7 个外显子及 6 个内含子。OPN 基因所编码的蛋白质含有特异的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 氨基酸序列, 这与许多细胞外基质蛋白的黏附序列相同, 对 OPN 的黏附功能起重要作用。肾脏 OPN 由亨利氏襻、近曲小管和肾乳头表面上皮分泌, 因这些部位是与尿石形成有关矿物质的高浓缩区, OPN 于此高表达有肯定的意义。

本研究采用乙二醇法致大鼠肾结石, 常规 HE 染色结果表明, 溶剂对照组大鼠肾组织结构正常, 未见草酸钙结晶; 模型组肾小管上皮肿胀、变性, 管腔内可见伊红染色坏死物质及部分脱落上皮细胞; 远曲小管、集合管和肾盂内均可见较多透明不规则小块状的草酸钙晶体, 部分近曲小管和间质内亦可见晶体, 多数肾脏结晶成堆分布相互连接, 甚至连接成片, 少数散在不连接。溶石颗粒剂组与模型组相比, 肾脏组织病理改变轻微, 大多数肾脏有散在的结晶, 部分呈广泛的不成堆分布或形成局限结晶, 个别肾脏有散在不连接的成堆

分脱落上皮细胞; 远曲小管、集合管和肾盂内均可见较多透明不规则小块状的草酸钙晶体, 部分近曲小管和间质内亦可见晶体, 多数肾脏结晶成堆分布相互连接, 甚至连接成片, 少数散在不连接。溶石颗粒剂各剂量组与模型组相比, 肾脏组织病理改变轻微, 大多数肾脏有散在的结晶, 部分呈广泛的不成堆分布或形成局限结晶, 个别肾脏有散在不连接的成堆结晶。溶石颗粒剂各剂量组大鼠肾脏草

表 3 溶石颗粒剂对结石模型大鼠肾 OPNmRNA表达的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of Rong Shi Granule on RT-PCR analysis of the expression level of osteopontin in the rat kidney($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别			OPN /GAPDH 净面积
未处理组			0.341 0 $\pm$ 0.153 5 ¹⁾
一周溶石颗粒剂 /g• kg ⁻¹	17.4	0.398 5 $\pm$ 0.163 8 ²⁾³⁾	
	11.6	0.717 1 $\pm$ 0.200 0 ¹⁾²⁾⁴⁾	
	5.8	0.860 6 $\pm$ 0.184 5 ¹⁾	
造模一周组			1.157 9 $\pm$ 0.368 4 ¹⁾
二周溶石颗粒剂 /g• kg ⁻¹	17.4	0.588 0 $\pm$ 0.108 9 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	
	11.6	0.784 9 $\pm$ 0.270 7 ¹⁾⁵⁾	
	5.8	0.933 2 $\pm$ 0.292 4 ¹⁾	
造模二周组			1.188 8 $\pm$ 0.263 1 ¹⁾
三周溶石颗粒剂 /g• kg ⁻¹	17.4	0.676 0 $\pm$ 0.174 4 ¹⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾	
	11.6	0.942 2 $\pm$ 0.227 2 ¹⁾⁷⁾	
	5.8	1.152 2 $\pm$ 0.154 3 ¹⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾	
造模三周组			1.397 5 $\pm$ 0.343 4 ¹⁾⁹⁾

注:与未处理组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与造模一周组比较,²⁾ $P < 0.01$;与一周溶石颗粒剂 5.8 g• kg⁻¹组比较,³⁾ $P < 0.01$;与一周溶石颗粒剂 17.4 g• kg⁻¹组比较,⁴⁾ $P < 0.05$;与造模二周组比较,⁵⁾ $P < 0.01$;与二周溶石颗粒剂 5.8 g• kg⁻¹组比较,⁶⁾ $P < 0.01$;与造模三周组比较,⁷⁾ $P < 0.01$;与三周溶石颗粒剂 11.6 g• kg⁻¹组比较,⁸⁾ $P < 0.05$;与三周溶石颗粒剂 17.4 g• kg⁻¹组比较,⁹⁾ $P < 0.01$;与一周溶石颗粒剂 5.8 g• kg⁻¹组比较,¹⁰⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.01$, vs solvent control group;²⁾ $P < 0.01$, vs model groups (Day 7);³⁾ $P < 0.01$, vs Rong Shi Granule 5.8 g• kg⁻¹ groups (Day 7);⁴⁾ $P < 0.05$, vs Rong Shi Granule 17.4 g• kg⁻¹ groups (Day 7);⁵⁾ $P < 0.01$, vs model groups (Day 14);⁶⁾ $P < 0.01$, vs Rong Shi Granule 5.8 g• kg⁻¹ groups (Day 14);⁷⁾ $P < 0.01$, vs model groups (Day 21);⁸⁾ $P < 0.05$, vs Rong Shi Granule 11.6 g• kg⁻¹ groups (Day 21);⁹⁾ $P < 0.01$, vs Rong Shi Granule 17.4 g• kg⁻¹ groups (Day 21);¹⁰⁾ $P < 0.05$, vs Rong Shi Granule 5.8 g• kg⁻¹ groups (Day 7)

低湿肾组织中草酸和钙含量及结晶面积比。提示溶石颗粒剂可有效地抑制乙二醇诱石过程所引起的肾损害,在体内有保护肾组织细胞的作用,表现为肾组织细胞器结构稳定,肾小管腔内渗出物减少,肾中草酸钙结晶程度和小管上皮损伤

程度的减轻等。因此推测溶石颗粒剂通过减轻草酸钙结晶对肾小管上皮损伤的程度,从而减少 OPN黏附于受损的上皮细胞表面的机会,减少晶体成核的位点。

REFERENCES

[1] Department of Pharmacology of Shanghai Medical College. Handbook of Clinical traditional Chinese medicine (中药临床手册) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977: 169.

[2] WANG Y S. Handbook of pharmacology and application of traditional Chinese medicine (中药药理与应用) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1983: 698.

[3] HUANG P, HUANG W H, WANG G F, *et al.* Effects of Rong Shi granule on renal stone fomation in rat urolithiasis model [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药 学), 2003, 20 (4): 271-273.

[4] HUANG P, HUANG W H, KONG F Z, *et al.* Pharmacodynamics tests of Litholytic granule on the anti-inflammatory, analgesic and diuretic actions[J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药 学), 2004, 21 (2): 106-108.

[5] Ministry of Health P. R. China. Bureau of Drug Administration & Policy. Collections of New Drug (Western Medicine) Pre-clinical Research Guidelines (Pharmacy, Pharmacology, Toxicology