

灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾间质及血管活性物质的影响

董敬远¹, 任亮², 陶志敏¹, 张素贞¹, 崔春蕾¹ (1.漯河市中心医院, 漯河医专一附院, 河南 漯河 462001; 2.漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

摘要: **目的** 研究灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾间质及血管活性物质的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和灯盏花素组。灯盏花素组给予灯盏花素 200 mg·kg⁻¹ 灌胃, 假手术组及模型组则给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃, 每天 1 次, 连续 7 d。HE 及 Masson 染色观察大鼠肾组织病理改变, 检测肾脏重量变化, 血液及肾组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 及内皮素 (ET-1) 和一氧化氮 (NO) 的含量。**结果** 模型组大鼠左侧肾脏肾间质可见大量炎性细胞浸润及充血,

作者简介: 董敬远, 男, 副主任药师 Tel: (0395)3330186 E-mail: djyuan999@126.com

且重量与假手术组比较显著增加($P<0.01$)。模型组大鼠血清中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量与假手术组相比存在明显差异($P<0.01$)。两侧肾组织中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量分别与假手术组存在明显差异($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。TGF- β_1 和 ET-1 含量升高而 NO 含量降低。而灯盏花素组大鼠肾间质损伤明显改善,左侧肾脏重量下降($P<0.05$),血清中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量、肾组织中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量分别与模型组存在明显差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),TGF- β_1 及 ET-1 含量降低而 NO 升高。结论 灯盏花素可通过下调血液及肾组织中 TGF- β_1 和 ET-1 含量、上调 NO 浓度等作用减轻梗阻性肾病肾间质病变。

关键词: 灯盏花素; 梗阻性肾病; 肾间质; 转化生长因子 β_1 ; 血管活性物质

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0109-04

Role of Breviscapine on Renal Interstitial and Vascular Active Matter in Rats with Obstructive Nephropathy

DONG Jingyuan¹, REN Liang², TAO Zhimin¹, ZHANG Suzhen¹, CUI Chunlei¹(1.Luohe Central Hospital, the First Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462001, China; 2.Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe and analyse the role of breviscapine on renal interstitial and vascular active matter in rats with obstructive nephropathy. **METHODS** The rats were randomly divided into three groups: sham group(SG), model group (MG) and breviscapine group(BG). Left ureters in MG and BG were ligated and then reproduced obstructive nephropathy model, while in SG the ureter was isolated only without further manipulation. The rats in BG were given breviscapine treatment(200 mg·kg⁻¹), SG and MG were given 0.5% CMC-Na once a day for seven days by gavage. The pathological changes in renal interstitial were observed by HE staining, changes in their serum level and renal tissue of TGF- β_1 , ET-1 and NO were determined. **RESULTS** There was serious hyperremia in renal interstitial, inflammatory cells infiltration in MG, also the left renals were heavier than those in SG($P<0.01$). The contents of TGF- β_1 and ET-1 in MG were increased but the activity of NO were declined in serum level than that in SG($P<0.01$), also the contents of TGF- β_1 and ET-1 in MG were increased but the activity of NO was declined in renal tissue than that in SG($P<0.01$, $P<0.001$). Hyperremia, infiltration, broking were significantly improved in BG. The left renals in BG were lighter than those in MG($P<0.05$). The contents of TGF- β_1 and ET-1 in BG were declined but the activity of NO was increased in serum level than that in MG($P<0.05$), also the contents of TGF- β_1 and ET-1 in BG were declined but the activity of NO was increased in renal tissue than that in MG($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** The changes of TGF- β_1 , ET-1 and NO may be significant correlated with renal interstitial in obstructive nephropathy. Also, the renal interstitial in obstructive nephropathy may be alleviated by breviscapine through down-regulating the TGF- β_1 in serum level and renal tissue, and protecting the vascular active matter, thus inhibitting the procedure of renal interstitial fibrosis.

KEY WORDS: breviscapine; obstructive nephropathy; renal interstitial; TGF- β_1 ; vascular active matter

各种慢性肾脏疾病发展的最终阶段是慢性肾功能衰竭(chronic rennal failure, CRF),其病理主要改变为肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)和肾小球硬化、肾小管凋亡等。而一些细胞因子如转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)在 RIF 的进程中起着重要作用^[1],RIF 可由多种因素引起,血管活性物质 NO 及 ET 等都参与其中。因此如何通过影响上述细胞因子有效减少肾间质损伤,阻止 RIF 的进程及防治 CRF 成为人们开始关注的问题。灯盏花素(breviscapine, Bre)是从活血化瘀药灯盏花中提取的类黄酮成分,具有扩张血管、降低血液黏稠度、改善微循环、防治血栓形成,抗肿瘤等作用^[2],实验研究显示,灯盏花素对 TGF- β_1 亦有较强的抑制作用^[3]。本实验主要观察灯盏花素对实验大鼠肾间质及血管活性物质的影响,为灯盏花素治疗 CRF 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物

SD 大鼠,♀,体质量 180~220 g,由河南医学实验动物中心提供,实验动物合格证号:医动字第 410115 号,经一周适应性饲养后使用。

1.2 药物和试剂

灯盏花素冻干粉针(每瓶 50 mg,湖南恒生制药有限公司产品,批号:20100403);NO 检测试剂盒和 ET-1 检测试剂盒(南京建成生物工程有 限公司,批号分别为 091116 和 100322);TGF- β_1 ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司,批号:100411)。

1.3 仪器

752N 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);GC-2016 型 γ 放射免疫计数仪(天津汇科仪器设备有限公司);550 型酶标仪(美国

Bio-RAD 公司); BX 40 光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.4 分组、造模及给药

将 SD 大鼠按照体质量随机分为 3 组, 每组 10 只。假手术组(SG): 采用 10%水合氯醛以 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔麻醉, 游离左侧输尿管后缝合, 给予 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液灌胃; 梗阻性肾病模型组(MG): 采用 10%水合氯醛以 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔麻醉, 分离左侧输尿管并在靠近肾盂处结扎及剪断输尿管后缝合, 制备梗阻性肾病大鼠模型, 给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液灌胃; 灯盏花素组(BTG): 制备梗阻性肾病大鼠模型后, 根据相关文献报道^[4]给予灯盏花素混悬液(由 0.5% CMC-Na 溶液配) $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃。所有动物于造模完成当日开始给药, 给药容积均为 $0.1 \text{ mL}\cdot(10 \text{ g})^{-1}$, 每天 1 次, 连续 7 d。

1.5 结果的测定

1.5.1 肾脏重量 给药结束后次日, 将各组大鼠麻醉后摘取两侧肾脏, 分别称重左右肾脏。

1.5.2 肾间质病理标本的制备 取部分左侧肾脏标本, 以 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片 $2 \mu\text{m}$ 进行 HE 和 Masson 染色, 光镜下观察肾间质的病理改变。

1.5.3 血清样品的制备 大鼠麻醉后眶静脉取血, 肝素抗凝处理后 $5\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血清置 4°C 冰箱备用。

1.5.4 肾组织匀浆样品的制备 将两侧肾脏分别置 -40°C 冰箱速冻后取出, 加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 液(pH 7.4, 加入前置入 4°C 冰箱预冷), 置组织匀浆器中反复研磨, 制成 10%的肾组织匀浆, $5\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液置 4°C 冰箱备用。

1.5.5 血浆及肾组织 TGF- β_1 、NO 及 ET-1 的含量测定 按试剂盒说明进行, 分别采用酶联免疫吸附法、比色法及放射免疫法测定。

1.6 数据分析

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据组间显著性差异采用单因素方差分析, 通过 SPSS 11.0 完成。

2 结果

2.1 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾脏重量的影响

由于模型是单侧输尿管阻塞, 故梗阻侧肾脏应显著增大。与假手术组相比, 模型组和灯盏花素组左侧肾脏体积增大, 重量增加($P<0.01$)。灯盏花素组与模型组相比, 差别也具有统计学意义

($P<0.05$)。各组大鼠右侧肾脏与假手术组相比略有增大, 差异没有统计学意义, 结果见表 1。

表 1 灯盏花素对各组大鼠肾脏重量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Effect of brviscapine on renal weights in rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	左侧肾脏重量/g	右侧肾脏重量/g
假手术组	0.76 ± 0.05	0.69 ± 0.04
模型组	$1.34 \pm 0.30^{1)}$	0.75 ± 0.06
灯盏花素组	$1.13 \pm 0.22^{1)2)}$	0.73 ± 0.05

注: 与假手术组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with SG, ¹⁾ $P<0.01$; compared with MG, ²⁾ $P<0.05$

2.2 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾脏病理改变的影响

HE 染色的病理切片显示, 假手术组大鼠肾脏无明显病理变化, 而模型组大鼠肾脏远端肾小管明显增宽, 间质中可见大量炎性细胞浸润, 管腔可见较多细胞管型。灯盏花素组大鼠肾脏亦存在肾间质充血、管型炎细胞等现象, 但较模型组轻微, 见图 1B 及 1C 处。Masson 染色的病理切片说明, 灯盏花素组肾间质纤维化程度较模型组明显改善, 见图 2B 及 2C。

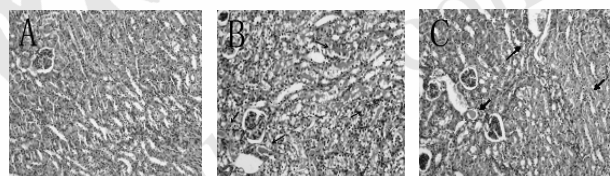


图 1 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾脏的影响(200 $\times$)

Fig 1 Effect of brviscapine on renal interstitial in rates with obstructive nephropathy by HE(200 $\times$)

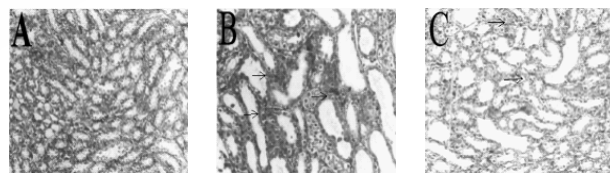


图 2 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾脏的影响病理切片图(200 $\times$)

Fig 2 Effect of brviscapine on renal interstitial in rates with obstructive nephropathy by Masson(200 $\times$)

A-假手术组; B-模型组; C-灯盏花素组

A-sham group; B-model group; C-brviscapine group

2.3 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠血清及肾组织 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量的影响

与假手术组相比, 模型组和灯盏花素组大鼠血清中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量存在明显差异($P<0.01$)。左右侧肾组织中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量分别与假手术组存在明显差异($P<0.01$ 或

$P<0.001$)。TGF- β_1 和 ET-1 含量升高而 NO 含量降低。而灯盏花素组大鼠血清中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量与模型组相比存在明显差异($P<0.05$)，其左右侧肾组织中 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量亦分别与模型组存在明显差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，TGF- β_1 及 ET-1 含量降低而 NO 升高，结果见表 2 和表 3。说明灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾间质损害的防治作用与灯盏花素对血清及肾组织中 TGF- β_1 及 ET-1、NO 等物质的影响密切相关。

表 3 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Effect of brviscapine on TGF- β_1 , NO and ET-1 in rats renal tissue with obstructive nephropathy($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	左侧肾脏			右侧肾脏		
	TGF- β_1 /pg·g·tissue ⁻¹	NO/nmol·g·tissue ⁻¹	ET-1/pg·g·tissue ⁻¹	TGF- β_1 /pg·g·tissue ⁻¹	NO/nmol·g·tissue ⁻¹	ET-1/pg·g·tissue ⁻¹
假手术组	133.39±16.72	22.50±2.80	83.59±16.97	150.26±20.50	28.77±5.60	92.15±22.39
模型组	923.54±145.18 ²⁾	10.00±2.61 ²⁾	236.67±68.85 ²⁾	310.33±67.66 ¹⁾	18.00±4.44 ¹⁾	167.88±63.71 ¹⁾
灯盏花素组	530.64±52.49 ²⁾⁴⁾	13.85±2.77 ¹⁾³⁾	130.65±36.36 ¹⁾⁴⁾	288.60±49.26 ¹⁾³⁾	22.25±7.23 ¹⁾³⁾	134.65±39.90 ¹⁾³⁾

注：与假手术组比较，¹⁾ $P<0.01$ ，²⁾ $P<0.001$ ；与模型组比较，³⁾ $P<0.05$ ，⁴⁾ $P<0.01$

Note: Compared with SG, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with MG, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

3 讨论

在多数肾脏疾病中，肾间质的纤维化程度可以反映肾功能受损程度，决定着慢性肾病患者的预后情况，因此 RIF 的研究成为肾脏疾病的关注重点。研究证实，TGF- β_1 是众多刺激肾间质发生纤维化改变的重要细胞因子之一，是迄今发现的最强的细胞外基质沉积促进剂，是梗阻性肾脏炎症与肾脏渐进性纤维化之间的枢纽^[5]。在本实验中，梗阻性肾病模型组大鼠的肾间质损害明显且血液及肾组织 TGF- β_1 较假手术组显著升高，进一步证明了 TGF- β_1 在肾间质损害及纤维化进程中起着重要作用，也说明灯盏花素对梗阻性肾病具有一定的防治作用。

杨海等^[6]发现灯盏花素有预防和减轻大鼠 RIF 的作用，其作用机制可能是通过下调 TGF- β_1 等的表达有关；彭海东等^[7]报道灯盏花素的扩张血管及改善微循环作用与 ET-1 降低和 NO 升高有关。笔者猜测灯盏花素对梗阻性肾病肾间质损害的防治作用亦可能是多途径的。于是本实验给予灯盏花素灌胃，检测了大鼠血浆及左右侧肾脏组织中 TGF- β_1 、ET-1 和 NO 含量的变化，证明灯盏花素对肾间质的防治作用与 TGF- β_1 、ET-1 和 NO 密切相关。而两侧肾脏血管活性物质的变化情况，说明血管活性物质 ET-1 和 NO 的调节亦是灯盏花素减轻肾间质损害和阻止纤维化进程的原因之一。本实验中笔者还发现大鼠血浆及两侧肾组织

表 2 灯盏花素对梗阻性肾病大鼠血清 TGF- β_1 及 NO、ET-1 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Effect of brviscapine on TGF- β_1 , NO and ET-1 in rats serum with obstructive nephropathy($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	TGF- β_1 /ng·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹	ET-1/ng·L ⁻¹
假手术组	148.52±21.46	24.08±1.30	41.85±16.42
模型组	562.43±110.28 ¹⁾	8.08±1.17 ¹⁾	107.33±15.98 ¹⁾
灯盏花素组	247.64±28.51 ¹⁾²⁾	13.73±1.93 ¹⁾²⁾	67.82±17.86 ¹⁾²⁾

注：与假手术组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with SG, ¹⁾ $P<0.01$; compared with MG, ²⁾ $P<0.05$

中 ET-1 和 NO、TGF- β_1 三者的含量变化呈现一定关联性，这是否说明血管活性物质与 TGF- β_1 之间存在相互影响，还需要进行更深入的研究。这些对进一步揭示灯盏花素多靶点作用机制和明确其临床用途，具有重要意义。

REFERENCES

- [1] QUAN G, CHOI J Y, LEE D S, et al. TGF- β_1 up-regulates transglutaminase two and fibronectin in dermal fibroblasts: a possible mechanism for the stabilization of tissue inflammation [J]. Arch Dermatol Res, 2005, 297(2): 84-90.
- [2] REN L, MA F, LI X L, et al. Study of breviscapine promotes HL-60 cell growth inhibiting by myleran [J]. J China Pharm(中国药房), 2010, 21(7): 1749-1750.
- [3] HE W, ZENG F D. Protetive effects of breviscapine on myocardial hypertrophy and fibrosis induced by isoproterenol in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2005, 21(12): 1514-1517.
- [4] DU G J, ZHANG S, LIN H H, et al. Protective action of breviscapine against bleomycin-induced lung fibrosis in mice [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2009, 21(12): 160-163.
- [5] CHAI W S, ZHAI S P, WU S L, et al. The effect of breviscapine on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2008, 24(1): 113-116.
- [6] YANG H, ZHANG Y, CHEN B C, et al. Protective effects of breviscapine on renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in rats [J]. Med J Chin PLA(解放军医学杂志), 2009, 34(10): 1206-1210.
- [7] PENG H D, TU J W, TIAN J. The role of breviscapine on vascular active matter in rats after ischemia and reperfusion [J]. J Emerg Syndromes Tradit Chin Med(中国中医急症), 2006, 15(2): 172-174.

收稿日期：2011-03-09