

# · 实验论著 ·

## 宽叶缬草对高胆固醇血症大鼠肾脏保护作用的探讨\*

司晓芸<sup>①</sup> 贾汝汉<sup>①△</sup> 黄从新<sup>①</sup> 丁国华<sup>①</sup> 刘红燕<sup>①</sup> 杨定平<sup>①</sup> 薛存宽<sup>②</sup>

〔摘要〕 目的 探讨宽叶缬草在脂质肾损害中的保护作用 and 可能机制。方法 用含 4% 胆固醇和 1% 胆酸钠的高脂饲料喂大鼠建立高脂模型, 观察宽叶缬草对大鼠血脂、尿蛋白和肾功能的影响, 以及对肾小球系膜细胞增殖、细胞外基质增生、 $\alpha$ -SMA 表达、IV 型胶原表达的影响。结果 宽叶缬草有降低总胆固醇、低密度脂蛋白和尿蛋白的作用 ( $P < 0.01$ ), 肾病理和免疫组化证实宽叶缬草在降脂和降低尿蛋白同时, 能减轻肾小球系膜病变和细胞外基质产生, 降低肾小球  $\alpha$ -SMA 和 IV 型胶原表达。结论 宽叶缬草的肾保护作用可能与降脂基础上的肾小球系膜细胞表型转化的抑制有关。

〔关键词〕 宽叶缬草 高胆固醇血症 肾小球 表型转化

### Protective Effect of Valeriana Officinalis Var Latifolia on Lipid Nephropathy in Hypercholesterolemic Rats

SI Xiaoyun, JIA Ruhan, HUANG Congxin, et al

Department of Nephrology, People's hospital of Wuhan University, Wuhan (430060)

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the protective effect of Valeriana officinalis var latifolia (VOL) on the kidneys of hypercholesterolemic rats and study its possible mechanisms. **Methods:** Dietary-induced hypercholesterolemia was induced in male Wistar rats by giving 4% cholesterol and 1% cholic acid diet lasting for 16 weeks. Changes of serum lipid, urinary protein excretion, renal function, Mesangial cell index and Mesangial matrix index were assessed; Moreover, immunohistochemical stain for  $\alpha$ -smooth muscle actin and type IV collagen were performed. **Results:** VOL not only could reduce the serum levels of total cholesterol and low density lipoprotein, but also could reduce urinary protein excretion. Light microscopic and immunohistochemical stain revealed that lowering serum lipids and urinary protein, Mesangial cell index and Mesangial matrix index were significantly reduced in the same time accompanied with decreased expression of  $\alpha$ -SMA and type IV collagen. **Conclusion:** It is concluded that VOL has the effect of regulating lipid metabolism, attenuating renal damage. The inhibition of glomerular mesangial cells undergoing phenotypic change might be the mechanism of VOL on renal protection.

**KEY WORDS** Valeriana officinalis var latifolia Dietary-induced hypercholesterolemia Glomerular Phenotypic change

自 1982 年 Moorhead 等率先提出脂质代谢异常的肾毒性学说后, 近十年来国内外学者通过内源性/实验性高脂血症动物模型, 均证实高脂血症尤其是高胆固醇血症具有肾毒性作用, 但其机制尚未完全阐明, 可能涉及肾小球内脂质沉积、系膜细胞和球内浸润的巨噬细胞对低密度脂蛋白的过量吞噬、细胞因子和活性氧分子释放、肾固有细胞表型转化等方面<sup>[1]</sup>。缬草为一类重要的中药资源, 有研究发现缬草提取物能调节血脂及抗脂质过氧化<sup>[2]</sup>。我们采用宽叶缬草预防性治疗实验性高胆固醇血症大鼠, 旨在了解宽叶缬草在脂质肾毒性中的可能肾保护作用。

### 材料与方法

#### 1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 170~220 g, 平均 12 周龄 (湖北省老年病研究所动物中心提供)。

1.2 药品与试剂 胆固醇 (武汉亚法生物技术公司)、胆酸钠 (北京化学试剂公司)、宽叶缬草提取物 (采集神龙架林区的宽叶缬草鲜根制成的乳白色液体, 每毫升含缬草挥发油 5 mg (湖北省老年病研究所薛存宽教授惠赠))。鼠抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA 抗体 福州迈新公司)、鼠抗 IV 型胶原 (武汉博士德公司)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化

\* 本课题为湖北省自然科学基金资助项目 (No. 99J142)

① 武汉大学人民医院肾内科 (武汉 430060)

② 湖北省老年病研究所 (武汉 430071)

△ 通讯作者

酶免疫组化染色超敏试剂盒( SP 福州迈新公司 )。

2 动物模型的制备和分组 采用完全随机的方法将 Wistar 大鼠分为三组 :高脂组( n = 8 )为高脂饲料喂养组 缙草组( n = 8 )为高脂饮食 + 宽叶缙草治疗组 正常组( n = 8 )为普通饲料组。在大鼠的普通饲料中分别按 4% 和 1% 的比例加入胆固醇和胆酸钠配制成高脂饲料( 蛋白含量 25% ),供高脂组和缙草组大鼠自由进食 正常组大鼠进食普通饲料。缙草组大鼠在进食高脂饲料同时 每日给予宽叶缙草提取物( 缙草挥发油剂量  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  )加生理盐水至 2 ml 灌胃 高脂组和正常组大鼠每日给予等量生理盐水灌胃。试验全过程为 16 周。

### 3 观察指标与方法

#### 3.1 血清生化指标、肾功能和尿蛋白测定

(1)血清脂质 :总胆固醇( TC ) 甘油三酯( TG ) 低密度脂蛋白( LDL )和高密度脂蛋白( HDL )由武汉大学人民医院检验科检测 (2)血清白蛋白( Alb ) 血肌酐( Scr ) 血尿素氮( BUN ):采用 Beckman 自动生化分析仪检测 (3)尿蛋白( UPE ) 尿肌酐 :分别采用磺基水杨酸法和苦味酸法检测 (4)肌酐清除率( Ccr )公式  $1 \{ (\text{尿肌酐测定值} / \text{标准值}) \times 24 \text{ h 尿量} (\text{ml}) \times 6.1389 \} / \text{血肌酐测定值}$ 。

3.2 肾脏病理学观察 用 1% 戊巴比妥钠( 30 mg/kg )腹腔内注射麻醉大鼠 取下右肾 称重后置 10% 中性福尔马林中固定 石蜡包埋。(1)光镜检查 :切片厚  $3 \mu\text{m}$  行 PAS 染色 采用 HPIAS-1000 高清晰度医学彩色病理图像分析系统 每张标本高倍镜下顺序观察皮质部分 10 个肾小球 测定肾小球面积( G ) 系膜基质面积( M ) 两者之比为系膜基质指数( M/G ) ;同时人工计数肾小球横

切面细胞核数 其与肾小球面积(  $\mu\text{m}^2$  )比作为肾小球细胞定量指数( MSC )。(2)免疫组织化学( SP )法 :切片常规脱蜡至水 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 磷酸盐缓冲液( PBS )冲洗 正常非免疫血清封闭后 依次加入一抗、二抗及链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶液孵育 DAB 显色 脱水、透明、封片。每组染色均以 PBS 代替一抗作为阴性对照。采用 HPIAS-1000 高清晰度医学彩色病理图像分析系统对免疫组化结果行半定量分析。每份标本测 10 个肾小球 用积分光密度( ILD )表示阳性物质的相对含量。

4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件分析处理 结果计量资料以均数  $\pm$  标准差表示 采用单因素方差分析 以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 结 果

### 1 宽叶缙草对血脂、尿蛋白和肾功能的影响

16 周时高脂组大鼠血清总胆固醇及低密度脂蛋白浓度显著高于缙草组和正常组(  $P < 0.01$  ) 缙草组大鼠血清总胆固醇及低密度脂蛋白浓度高于正常组(  $P < 0.01$  )。甘油三酯和高密度脂蛋白三组间差异不显著(  $P > 0.05$  ) (见表 1)。16 周时高脂组大鼠血肌酐和尿蛋白较缙草组和正常组明显增高(  $P < 0.01$  ) 缙草组大鼠尿蛋白高于正常组(  $P < 0.05$  )。血尿素氮高脂组较缙草组和正常组有所升高 血白蛋白和内生肌酐清除率高脂组较缙草组和正常组有所下降 但三组间无统计学差异 (见表 2)。

表 1 三组大鼠血脂比较 (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	鼠数	TC( mmol/L )	TG( mmol/L )	HDL( mmol/L )	LDL( mmol/L )
高脂组	8	$5.18 \pm 1.06^{**}$	$0.89 \pm 0.26$	$0.41 \pm 0.06$	$1.99 \pm 0.57^{**}$
缙草组	8	$2.89 \pm 0.39^{***\#}$	$0.94 \pm 0.25$	$0.46 \pm 0.14$	$0.97 \pm 0.09^{***\#}$
正常组	8	$1.01 \pm 0.28$	$0.67 \pm 0.31$	$0.43 \pm 0.13$	$0.32 \pm 0.07$

注 :与正常组比较 , \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$  ;与高脂组比较 , #  $P < 0.01$

表 2 三组大鼠尿蛋白和肾功能比较 (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	鼠数	Alb( g/L )	BUN( mmol/L )	UPE( mg/24h )	Scr( $\mu\text{mol/L}$ )	Ccr( ml/min )
高脂组	8	$18.05 \pm 2.36$	$6.84 \pm 1.29$	$21.94 \pm 3.00^{**}$	$67.81 \pm 12.83^{**}$	$1.00 \pm 0.29$
缙草组	8	$18.58 \pm 3.10$	$6.46 \pm 1.28$	$11.31 \pm 2.34^{***\#}$	$50.56 \pm 10.61^{\#}$	$1.05 \pm 0.27$
正常组	8	$20.85 \pm 3.68$	$6.30 \pm 0.60$	$6.85 \pm 2.98$	$44.68 \pm 8.08$	$1.23 \pm 0.30$

注 :与正常组比较 , \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$  ;与高脂组比较 , #  $P < 0.05$  , ##  $P < 0.01$

### 2 宽叶缙草对大鼠体重和右肾重/体重的影响

高脂组大鼠 16 周时体重明显轻于缙草组和正常组(  $P < 0.01$  ) ,而右肾重/体重比值显著高于缙草组和正常组(  $P < 0.01$  ) ,右肾重/体重比值缙草组较正常组有所升高( 见表 3 )。

### 3 肾脏病理改变

3.1 光镜 高脂组大鼠多数肾小球系膜基质呈中重度增多 细胞数增多明显 基底膜轻中度不规则增厚 肾小球局部可有空泡形成 偶见肾小球局灶节段性硬化。而缙草组大鼠肾小球系膜细胞

增生和基质增多明显减轻,肾小球系膜基质指数和细胞定量指数也明显低于高脂组(见表 3)。

3.2  $\alpha$ -SMA、IV 型胶原表达 高脂组大鼠肾小球内  $\alpha$ -SMA 明显表达,阳性物质主要位于肾小球系膜区和球囊粘连处;缬草组中  $\alpha$ -SMA

在肾小球为轻度表达;而正常组  $\alpha$ -SMA 在肾小球偶见散在表达。IV 型胶原在高脂组中表达明显增强,多位于系膜区;缬草组中 IV 型胶原表达显著减少(见表 3)。

表 3 三组大鼠病理学结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	体重(g)	右肾重/体重(%)	M/G	MSC(%)	$\alpha$ -SMA	IV 型胶原
高脂组	8	408±34**	0.34±0.04**	0.47±0.06**	0.44±0.14**	3.62±0.22**	4.41±0.32**
缬草组	8	449±51#	0.27±0.02**##	0.34±0.05**##	0.30±0.10**#	1.90±0.09**##	2.77±0.25**##
正常组	8	484±48	0.21±0.01	0.26±0.06	0.16±0.09	0.71±0.11	1.73±0.34

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与高脂组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

### 讨 论

1 宽叶缬草对高胆固醇血症大鼠肾小球病变的保护作用 实验发现,高胆固醇血症大鼠 16 周时肾小球出现明显的病理改变,包括肾小球体积增大、系膜细胞增生、系膜基质增多、肾小球内细胞数增加、肾小球内局部空泡形成及偶见的局灶节段性硬化等,符合高胆固醇血症致肾损害的早期形态学改变<sup>[3]</sup>。实验过程中高脂组大鼠总胆固醇和低密度脂蛋白明显上升,尿蛋白和血肌酐显著增高,肾重/体重比值明显高于对照组,但血尿素氮、肌酐清除率和血清蛋白改变不明显,提示该高胆固醇血症模型中高脂对肾脏的损伤尚处于早期阶段<sup>[4]</sup>。宽叶缬草为一种多年生野生草本植物,性平味甘,其根和根状茎可入药,具有镇静安神、解痉止痛的功效<sup>[5]</sup>,近年来有研究发现缬草提取物尚能扩张血管、调节血脂及抗脂质过氧化<sup>[2]</sup>。我们的实验发现,高胆固醇血症大鼠接受宽叶缬草治疗 16 周后,总胆固醇和低密度脂蛋白较高脂组明显下降,尿蛋白和血肌酐也有显著减少,表明宽叶缬草能够降低血脂和保护肾功能;同时,缬草组大鼠肾重/体重比和肾小球病理改变也较高脂组减轻,表明缬草对高胆固醇血症大鼠的肾小球病变也具有保护作用。

2 宽叶缬草对高脂血症大鼠肾小球病变保护作用的可能机制 肾小球系膜细胞是肾小球疾病时致病因子作用的主要靶细胞之一,其增殖及分泌大量细胞外基质在肾小球硬化过程中起重要作用。 $\alpha$ -SMA 是系膜细胞表型转化的良好标志<sup>[6]</sup>,它的表达增高提示系膜细胞由静止表型被激活,转化为增殖表型和/或分泌表型,从而使系膜细胞具有了肌纤维细胞样特性。正常大鼠肾脏中除肌性血管外,其他组织构分中见不到或仅可见极为微弱的  $\alpha$ -SMA 表达,而肾小球疾病过程中,系膜细胞可大量增殖并伴  $\alpha$ -SMA 表达增多,呈现活化表型,并通过自分泌和旁分泌方式参与疾病的进一步发展<sup>[7]</sup>。我们的实验中,高胆固醇血症大鼠 16 周

时肾小球系膜区和球囊周围  $\alpha$ -SMA 呈灶状增加,细胞外基质成分 IV 型胶原明显增多,两者之间呈正相关关系( $r=0.957, P<0.05$ ),提示病理状态下高脂可能导致系膜细胞发生表型转化而激活,系膜细胞被激活后先表达  $\alpha$ -SMA 而后产生大量的 IV 型胶原等基质成分而加重肾损伤。而接受宽叶缬草治疗 16 周的大鼠中,  $\alpha$ -SMA 和 IV 型胶原的表达均较高脂组大鼠有显著下降,并伴有系膜基质和系膜细胞增生的下调,肾小球病变减轻。综上所述我们认为,宽叶缬草保护肾脏的一种可能机制也许是在有效降脂的基础上,抑制了肾小球系膜细胞向肌纤维样细胞的表型转化,导致细胞外基质的产生减少,从而延缓了肾小球病变恶化的进程。但宽叶缬草通过何种环节抑制肾小球系膜细胞的表型转化,尚有待于进一步的研究。

总之,脂质代谢异常可导致肾小球的损害及肾脏疾病的进行性发展,积极防治高脂血症对防治或延缓肾脏疾病进行性恶化具有实际意义。缬草为一类重要的中药资源,其在降脂和肾脏保护中的作用值得我们进一步研究。

### 参 考 文 献

1. Gui jirro C, Kasiske BL, Kim Y, et al. Early glomerular changes in rats with dietary - induced hypercholesterolemia. Am J Kid Dis, 1995, 26: 152 - 161.
2. 杨桂元, 王玮. 宽叶缬草治疗冠心病的临床研究. 中国中西医结合杂志, 1994, 9: 540 - 542.
3. Kasiske BL, O Donnell MP, Schmitz PG, et al. Renal injury of diet - induced hypercholesterolemia in rats. Kidney Int, 1990, 37: 880.
4. Jaap AJ, Uta K, Ulf J, et al. Early mechanism of renal injury in hyper - cholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. J Am Sol Nephrol, 2000, 11: 669 - 683.
5. 李时珍. 本草纲目(草部). 第 14 卷 854.
6. Johnson RJ, Lida H, Alpers CE, et al. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. J Clin Invest, 1991, 87: 847 - 850.
7. Taha AS, Jiri F, Alex BM. Glomerular disease in hypercholesterolemic guinea pigs: A pathogenetic study. Kidney Int, 1988, 33: 498 - 507. (收稿 2001 - 10 - 19)