

缬草油和辛伐他汀延缓高胆固醇血症大鼠肾损伤的对比研究

司晓芸¹, 吴小燕¹, 贾汝汉²

(1. 武汉大学中南医院肾内科, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉大学人民医院肾内科)

【摘要】 目的 探讨缬草油对高胆固醇血症肾损伤的保护作用和可能机制。方法 大鼠随机分为正常组、高脂组、缬草油低剂量[12.5 mg/(kg·d)]、中剂量[25 mg/(kg·d)]、高剂量[50 mg/(kg·d)]组、他汀[5 mg/(kg·d)]组,用含4%胆固醇和1%胆酸钠的高脂饲料饲喂大鼠建立高脂模型。检测各组血脂、尿蛋白、肾功能变化,观察肾脏病理学改变,免疫组化法检测肾小球整合素 $\alpha 3\beta 1$ 表达,RT-PCR法检测肾小球整合素 $\alpha 3\beta 1$ 和TGF- $\beta 1$ mRNA表达。结果 中、高剂量缬草油和辛伐他汀均能显著降低大鼠血脂和血肌酐,组间疗效差异无统计学意义($P > 0.05$)。8周时缬草中、高剂量组24 h尿蛋白明显降低,而他汀组16周时尿蛋白排泄方有所下降。缬草组较高脂组病理改变明显减轻,而他汀组病理改变轻度改善。缬草组 $\alpha 3\beta 1$ 表达量较高脂组明显上升,他汀组表达量有所上升,与缬草组比较差异有统计学意义。缬草组TGF- $\beta 1$ mRNA表达较高脂组明显减弱,下降程度较他汀组更明显。结论 缬草油可能通过降脂、上调整合素 $\alpha 3\beta 1$ 表达,减少TGF- $\beta 1$ 表达发挥肾保护作用,其延缓肾损伤作用较辛伐他汀更突出。

【关键词】 缬草/药理学; 辛伐他汀/药理学; 高胆固醇血症/并发症; 肾疾病

Contrasting study of Valerian oil and simvastatin on lipid-induced nephropathy in Hypercholesterolemic rats

SI Xiao-yun, WU Xiao-yan, JIA Ru-han. Department of Nephrology, Zhongnan hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the protective effect of Valerian oil on lipid-induced nephropathy in Hypercholesterolemic rats and study its possible mechanisms. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, hyperlipidemia group, low-dose [12.5 mg/(kg·d)] valerian oil group, middle-dose [25 mg/(kg·d)] valerian oil group, high-dose [50 mg/(kg·d)] valerian oil group and simvastatin group [5 mg/(kg·d) for lavage]. Dietary-induced hyperlipidemia were by given 4% cholesterol and 1% cholic acid diet for 16 weeks. Changes of serum lipid, urinary albumin, renal function and renal pathobiology index were assessed. The expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ in glomeruli was detected by immunohistochemical stain, the expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ and TGF- $\beta 1$ mRNA were detected by RT-PCR at the same time. **Results** The serum levels of total cholesterol, low density lipoprotein and serum creatinine in Valerian group and simvastatin group were decreased more than that in hyperlipidemia group. Urinary albumin excretion was significantly reduced in Valerian group after treatment for 8 weeks, and significantly reduced in simvastatin group after 16 weeks. The morphological analysis revealed that the pathobiology index in Valerian group were significantly decreased than that in simvastatin group after 16 weeks. At the same time, the expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ mRNA and protein in Valerian group were significantly increased than that in hyperlipidemia group and simvastatin group, and the expression of TGF- $\beta 1$ mRNA were markedly decreased in Valerian group. The treatment effect in Valerian group was better than that in simvastatin group. **Conclusion** Valerian oil has the protective effects on lipid-induced nephropathy by decreasing serum lipid, increasing the expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ and inhibiting the expression of TGF- $\beta 1$. The protective effects of Valerian oil are better than simvastatin.

【Key words】 VALERIANA OFFICINALIS Δ /PD; Simvastatin/PD; Hypercholesterolemia/CO; Kidney diseases

近年来研究证实高脂血症尤其是高胆固醇血症具有肾毒性作用,能导致肾小球硬化、加速肾衰竭进程^[1]。缬草性平味辛,具有镇静安神、解痉止痛的功效,研究发现缬草提取物不仅能调节血脂及抗脂质过氧化,而且对慢性肾衰竭的进程有延缓作用^[2]。而他汀类药物作为传统的降脂药,其调脂和肾保护作用已由大量研究所证实^[3]。笔者于2005年9月~2006年6月在本院中心实验室采用高脂饮食诱导脂质肾损害模型,比较了缬草油和辛伐他汀在高胆固醇血症大鼠脂代谢紊乱调节和肾保护中的差异,以探讨缬草油对脂质肾损害肾保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 模型制备与动物分组

大鼠48只,由武汉大学实验动物中心提供。随机分为6组:正常组、高脂组、缬草油低剂量[缬低组,12.5 mg/(kg·d)]、中剂量[缬中组,25 mg/(kg·d)]、高剂量[缬高组,50 mg/(kg·d)]治疗组、他汀[5 mg/(kg·d)]组,8只/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高脂饲料(饲料的可溶性蛋白含量为25%,脂肪含量19.3%),供高脂组、缬草组、他汀组大鼠自由进食,正常组大鼠进食普通饲料。缬草组和他汀组大鼠在进食高脂饲料同时,每日早上固定时间分别给予缬草油(5 mg/ml,华中科技大学同济医学院老年医药学研究所薛存宽教授惠赠)和辛伐他汀(默沙东公司)灌胃,高脂组和正常组给予等量生理盐水灌胃。试验全过程为16周。

1.2 观察指标

1.2.1 血脂、尿蛋白及肾功能测定 (1)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)均采用 Beckman 自动生化分析仪检测。(2)血肌酐(Scr):Beckman 自动生化分析仪检测。(3)24 h 尿蛋白(UPE)定量:代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,用磺基水杨酸法检测尿蛋白。

1.2.2 肾脏病理学观察 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉大鼠,取肾并称重。(1)光镜:部分肾组织置 10%中性福尔马林中固定,石蜡包埋,切片厚 3 μm,行 PAS 染色后镜检。(2)透射电镜:部分肾组织预固定 4 h 后,再固定于 1%锇酸,Epon812 包埋,切片厚 50 nm,铀铅双重染色,日立 H-500 型透射电镜观察。

1.2.3 肾小球整合素 α3 蛋白表达 免疫组织化学(SP)法检测整合素 α3 亚单位,代表 α3β1 表达,PBS 代替一抗作为阴性对照。HPIAS-1000 型医学彩色病理图像分析系统行半定量分析,用积分吸光度表示阳性物质的相对含量。

1.2.4 肾小球整合素 α3 mRNA、TGF-β1 mRNA 表达 RT-PCR 法检测:Trizol 试剂提取肾小球总 RNA,反转录制备 cDNA。总反应体积 50 μl,5 μl RNA,上下游引物各 1 μl。以 GAPDH 为内参照进行 PCR 扩增。整合素 α3 引物:上游 5'-CAACATTACCAATGTGACCGTG-3';下游 5'-CATGGTACTTGGCCATAATCC-3';扩增产物

片段为 478 bp。TGF-β1 引物:上游 5'-GGACTAC-TACGCCAAAGA AG-3';下游 5'-TCAAAAAGACAGCCACT-CAGG-3';扩增产物片段为 294 bp。GAPDH 引物:上游 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3';下游 5'-AGATCCACA ACGGATACATT-3';扩增产物片段为 308 bp。PCR 扩增条件:94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,40 次循环后,再行 72℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物 10 μl 于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳,5 μg/ml 溴化乙啶染色, SX-100 凝胶图像处理系统分析产物的量。

1.3 统计学处理 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 11.0 软件进行方差分析和 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂、尿蛋白和肾功能 缬草中、高剂量组和他汀组血 TC 和 LDL 较高脂组明显降低 (*P* < 0.01),而他汀组降低为甚,但 3 组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。治疗前后 TG 和 HDL 各组间无明显变化。8 周时缬草中、高剂量组 UPE 较高脂组显著下降 (*P* < 0.01),而他汀组 UPE 与高脂组相比差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。16 周时缬草中、高剂量组和他汀组 UPE 均较高脂组明显下降,以缬草组下降更显著,与他汀组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。16 周时缬草中、高剂量组 Scr 下降较高脂组更明显,但他汀组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠血脂、尿蛋白和肾功能结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	8周				16周			
	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	UPE (mg/24h)	Scr (μmol/L)	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	UPE (mg/24h)	Scr (μmol/L)
高脂组	4.43 ± 0.38	1.65 ± 0.31	18.26 ± 6.46	60.66 ± 9.27	6.56 ± 1.11	2.68 ± 0.77	25.74 ± 5.05	75.58 ± 11.13
缬低组	4.08 ± 0.27*	1.51 ± 0.22*	16.33 ± 4.24	61.82 ± 8.63	5.75 ± 0.86*	2.61 ± 0.54*	22.42 ± 4.18	70.91 ± 9.57
缬中组	2.27 ± 0.26*	1.05 ± 0.13*	9.25 ± 2.41**	58.32 ± 10.61	2.99 ± 0.36*	1.15 ± 0.14*	11.09 ± 2.15**	57.94 ± 6.28*
缬高组	2.22 ± 0.31*	0.93 ± 0.11*	8.96 ± 1.98**	58.74 ± 9.82	2.45 ± 0.41*	1.07 ± 0.12*	9.88 ± 1.74**	58.11 ± 6.03*
他汀组	1.96 ± 0.19*	0.86 ± 0.19*	16.21 ± 5.74	55.76 ± 11.53	2.62 ± 0.24*	0.95 ± 0.11*	14.15 ± 2.76*	61.87 ± 6.31*
正常组	1.11 ± 0.17	0.41 ± 0.12	6.07 ± 1.61	51.16 ± 10.01	1.43 ± 0.16	0.39 ± 0.08	7.35 ± 1.18	48.26 ± 5.15

注:组间比较, *F* = 22.67, 24.34, 5.87, 16.16, *P* < 0.01; 与高脂组比较:(8周)TC: *t* = 3.33, **P* < 0.01; UPE: *t* = 12.19, **P* < 0.01; (16周)TC: *t* = 5.13, **P* < 0.01; UPE: *t* = 18.39, *P* < 0.01; 与他汀组比较:(8周)TC: *t* = 2.47, **P* < 0.05; UPE: *t* = 7.25, **P* < 0.05; (16周)TC: *t* = 3.94, **P* < 0.05; UPE: *t* = 8.26, **P* < 0.05

2.2 肾脏病理学改变 高脂组多数肾小球系膜基质中重度增多,基底膜中重度不规则增厚,偶见局灶节段性硬化;肾小管多灶状萎缩和代偿性肥大;肾间质多灶状单个核细胞浸润。缬草中、高剂量组和他汀组上述病理改变较高脂组减轻,以缬草组改善更明显。电镜下高脂组足细胞浓缩,脂滴出现,胞核不规则,部分足突融合、消失;缬草中、高剂量组病变较高脂组明显减

轻,他汀组病变有所减轻(图 1)。

2.3 肾小球整合素 α3 mRNA、TGF-β1 mRNA 表达 高脂组整合素 α3 mRNA 表达水平下调;缬草中、高剂量组表达量较高脂组明显上升,他汀组表达量有所上升,与缬草组比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。高脂组 TGF-β1 mRNA 表达最为丰富,缬草组表达较高脂组明显减弱,他汀组表达有所减弱。见表 2。

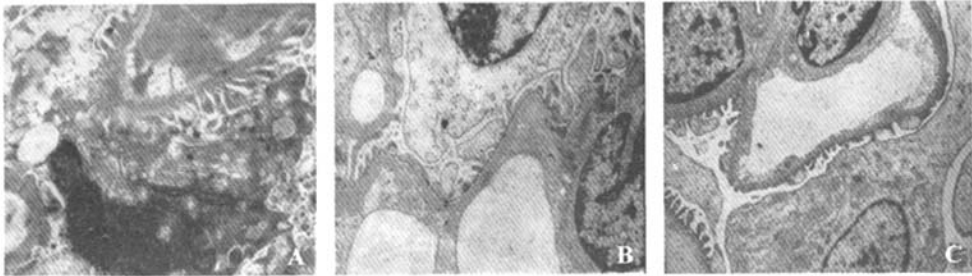


图1 电镜观察大鼠肾脏病变($\times 7000$) A:高脂组,足细胞浓缩、胞核不规则、脂滴出现、足突融合、消失;B:缬草中剂量组,部分足突融合;C:他汀组,大部分足突融合、消失

2.4 肾小球整合素 $\alpha 3$ 蛋白表达 正常组肾小球整合素 $\alpha 3$ 主要沿基底膜呈线性分布,系膜区有少量表达;高脂组整合素 $\alpha 3$ 表达强度显著减弱;缬草中、高剂量组和他汀组表达量较高脂组有所上升,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠肾小球整合素 $\alpha 3$ 蛋白、mRNA和TGF- $\beta 1$ mRNA表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	整合素 $\alpha 3$ 蛋白	整合素 $\alpha 3$ /GAPDH	TGF- $\beta 1$ /GAPDH
高脂组	0.83 \pm 0.17	0.31 \pm 0.04	1.69 \pm 0.21
缬低组	0.86 \pm 0.22	0.38 \pm 0.01	1.44 \pm 0.34
缬中组	1.88 \pm 0.20 ^{***}	0.95 \pm 0.11 ^{***}	0.65 \pm 0.12 ^{***}
缬高组	1.94 \pm 0.17 ^{***}	0.91 \pm 0.23 ^{***}	0.59 \pm 0.11 ^{***}
他汀组	1.22 \pm 0.14 [*]	0.61 \pm 0.08 [*]	1.04 \pm 0.09 [*]
正常组	2.37 \pm 0.21	1.27 \pm 0.13	0.18 \pm 0.06

注:组间比较, $F = 13.8, 10.07, 8.81, P < 0.01$;与高脂组比较,^{*} $P < 0.05$;与他汀组比较,^{**} $P < 0.05$

3 讨论

高血脂与肾损害之间的密切联系早已为国内外许多学者所证实,高脂血症尤其是高胆固醇血症能够导致肾硬化的发生,加速肾衰竭进程。本实验饲以大鼠高脂饮食16周,实验结束时大鼠血中TC和LDL明显升高,在血脂升高同时UPE和Scr也明显增加,病理学观察发现大鼠肾小球和小管间质炎性细胞浸润、基底膜不规则增厚、基质增生和纤维化,证实高脂的存在确实可诱导大鼠肾脏出现结构和功能损伤。

缬草为败酱科缬草属的多年生野生植物,主要有效部位在其挥发油与非挥发性酯类,而挥发油中单萜及倍半萜的含氧衍生物约占油全量的55%,是挥发油中的主要活性组份,其有效成分尚不完全清楚。笔者既往研究证实缬草油能调节血脂,抗脂质过氧化和延

缓肾损伤^[2]。本实验将缬草油与临床常用降脂药辛伐他汀作对比研究,结果发现,中、高剂量缬草油能显著改善高脂大鼠脂代谢紊乱,主要表现为以降低TC和LDL为主,对HDL无显著影响。虽然其降脂作用起效较辛伐他汀慢,但治疗过程中对于血脂的改善作用与辛伐他汀相比差异无统计学意义。大鼠在血脂下降同时,尿蛋白减少,Scr下降,小球和小管间质病理损伤明显减轻,表明降脂治疗是缬草油发挥肾保护作用的机制之一。与辛伐他汀相比,缬草油对UPE、Scr和病理损伤的改善作用更为明显,提示缬草油除降脂外,可能通过多个环节发挥肾保护作用。

高胆固醇血症可直接造成足细胞损伤,而足细胞病变在蛋白尿的发生中起重要作用^[4]。足细胞不仅能形成和维持正常肾小球基底膜,而且通过表面广泛分布的整合素将其细胞骨架紧密连接在基底膜和相邻的毛细血管上。整合素 $\alpha 3\beta 1$ 是足细胞上唯一的 $\beta 1$ 类整合素,能通过 $\alpha 3$ 亚单位与基底膜作用,是足细胞贴附于基底膜的主要受体,可维持足细胞正常功能和表型,防止蛋白尿发生^[5]。本实验观察到,中、高剂量缬草油降尿蛋白排泄作用较明显,8周时即能显著降低高脂大鼠UPE,此时辛伐他汀组尿蛋白排泄虽有所下降但与高脂组比较差异无统计学意义;且16周时其尿蛋白改善作用仍明显强于辛伐他汀组。观察足细胞的超微结构发现,电镜下中、高剂量缬草油较辛伐他汀明显减轻足细胞水肿、浓缩和足突融合;与此同时,整合素 $\alpha 3\beta 1$ 蛋白和mRNA表达较高脂组显著升高,且与辛伐他汀组间存在显著性差异。推测缬草油可能通过减轻足细胞损伤,抑制足细胞从基底膜脱落,降低尿蛋白而发挥肾保护作用。

TGF- $\beta 1$ 是目前公认的致肾纤维化关键性因素之一,本实验中,高脂大鼠接受缬草油治疗后,肾内TGF- $\beta 1$ 表达明显下调,提示缬草油的肾保护机制可能部分与调节TGF- $\beta 1$ 表达有关。其下调作用强于辛伐他汀,推测缬草油除通过直接降脂下调TGF- $\beta 1$ 表达外,尚可

肿瘤坏死因子受体-IgG1Fc 段融合蛋白对脂多糖致大鼠急性肾损伤的保护作用

王世婷, 郭竹英*, 徐芒华, 矫强, 高丰厚

(上海交通大学医学院附属第三人民医院实验中心, 上海 201900)

【摘要】 目的 探讨重组人肿瘤坏死因子受体-IgG1Fc 段融合蛋白(rhuTNFR:Fc)对脂多糖(LPS)致大鼠急性肾损伤的保护作用及机制。方法 采用静脉注射 LPS 建立大鼠急性肾损伤模型。Sprague-Dawley 大鼠随机分为对照组、rhuTNFR:Fc 组、LPS 组和 rhuTNFR:Fc + LPS 组。监测各组大鼠平均动脉压(MAP)变化情况, 血液尿素氮(BUN)及肌酐(Cr)水平, 观察肾组织病理学改变, 同时检测血清 TNF- α 含量及其生物活性, 并测定肾组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和髓过氧化物酶(MPO)活性。结果 rhuTNFR:Fc 预处理能显著降低 TNF- α 生物活性, 改善肾功能, 减轻 LPS 所致病理损伤及 MPO 活力的增高, 但对组织 MDA 含量及 SOD 活力无明显影响。结论 rhuTNFR:Fc 预处理可以部分减轻 LPS 引起的大鼠急性肾损伤。

【关键词】 受体, 肿瘤坏死因子; 重组融合蛋白质类; 肾疾病; 脂多糖类

Protection effects of soluble TNFR:Fc fusion protein on acute kidney injury induced by lipopolysaccharide in rats

WANG Shi-ting, GUO Zhu-ying, XU Mang-hua, JIAO Qiang, GAO Feng-hou. Experimental Center, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effects of recombinant human tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein (rhuTNFR:Fc) on the acute renal injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats. **Methods** Models of acute renal injury in rats were constructed by intravenous injection of LPS 10 mg/kg. Forty-eight SD rats weighing 180~240g were randomly divided into 4 groups with 12 animals each group, including control group, rhuTNFR:Fc group, LPS group and rhuTNFR:Fc + LPS group. Mean arterial pressure (MAP) was continuously monitored for 6 h. The levels of blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), TNF- α as well as TNF- α bioactivity were assessed. The myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) activity, content of malondialdehyde (MDA) were also measured. Pathologic changes of lung tissue in each group were observed by HE staining. **Results** Compared with LPS group, the status of hypotension and pathological manifestation in kidneys were ameliorated, and MPO activity significantly decreased in rhuTNFR:Fc + LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion** These data suggest that rhuTNFR:Fc can ablate the rise in serum TNF- α bioactivity that occurs in response to LPS, and rhuTNFR:Fc could in part protect rats from the acute renal injury induced by LPS.

【Key words】 Receptors, tumor necrosis factor; Recombinant fusion proteins; Kidney disease; Lipopolysaccharides

* 通讯作者

能通过其他途径减少 TGF- β 1 表达, 如抑制肾皮质内蛋白激酶 C 激活^[6]、抑制肾固有细胞表型转化^[7]、降低体内尤其是局部血管活性因子如血小板源性生长因子、内皮素等的产生有关。

总之, 缬草油能显著改善脂质肾损害的脂代谢紊乱, 降低尿白蛋白排泄, 稳定足细胞, 下调 TGF- β 1 表达, 其延缓肾损伤作用较辛伐他汀更突出。

参考文献

- [1] Nakao A, Nosaka K, Imaki H, et al. Effects of probucol on renal function and urinary protein excretion in spontaneously hypercholesterolemic rats fed a normal or high cholesterol diet. *Kidney Blood Press Res*, 2004, 27(2): 96-104.
- [2] 司晓芸, 贾汝汉, 黄从新, 等. 宽叶缬草对高胆固醇血症大鼠肾组

织内 TGF- β 1 表达的影响. *中国中药杂志*, 2003, 28(9): 845-848.

- [3] 熊燕, 贾汝汉, 李春玉, 等. 辛伐他汀对糖尿病大鼠早期肾损伤的保护作用的实验研究. *中国医师杂志*, 2005, 7(11): 1491-1492.
- [4] Yi F, dos Santos EA, Xia M, et al. Podocyte injury and glomerulosclerosis in hyperhomocysteinemic rats. *Am J Nephrol*, 2007, 27(3): 262-268.
- [5] Reiser J, Oh J, Shirato I, et al. Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J Biol Chem*, 2004, 279(33): 34827-34832.
- [6] 陈玲, 贾汝汉, 丁国华, 等. 缬草油对 2 型糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制探讨. *中华肾脏病杂志*, 2003, 3: 168-172.
- [7] 司晓芸, 贾汝汉, 黄从新, 等. 宽叶缬草在抑制高胆固醇血症大鼠肾小管上皮细胞转化中的作用. *现代医学*, 2002, 3: 144-147.

[收稿日期: 2008-05-20]

(本文编辑: 陈林立)