

缬草油对高胆固醇血症大鼠肾小管上皮细胞巢蛋白表达的影响

司晓芸^① 吴小燕^① 贾汝汉^②

【摘要】 目的:探讨缬草油对高胆固醇血症大鼠肾小管上皮细胞巢蛋白表达的影响。方法:大鼠随机分为正常组、高脂组、缬草油(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组和辛伐他汀(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)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。观察 8、12、16 周时各组大鼠血脂、尿蛋白、血肌酐和肾小管间质病理改变,免疫组化法检测肾小管上皮细胞巢蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达。结果:随时间延长,高脂大鼠肾小管上皮细胞逐渐出现巢蛋白和 α-SMA 表达。巢蛋白表达与总胆固醇、低密度脂蛋白、24 h 尿蛋白、血肌酐正相关($r=0.963, 0.830, 0.944, 0.706, P<0.01$),与肾小管间质损伤指数正相关($r=0.974, P<0.01$),与 α-SMA 呈正相关($r=0.804, P<0.01$)。缬草油能显著降低大鼠血总胆固醇、低密度脂蛋白、24 h 尿蛋白和血肌酐,下调肾小管上皮细胞巢蛋白和 α-SMA 表达($P<0.01$)。在巢蛋白表达减少同时,肾小管间质损伤和纤维化明显改善,其改善作用较辛伐他汀更明显($P<0.05$)。结论:缬草油可能通过降脂、下调肾小管上皮细胞巢蛋白表达减轻高胆固醇血症大鼠肾间质纤维化。

【关键词】 缬草 高胆固醇血症 肾间质纤维化 巢蛋白

Effect of Valerian Oil on Expression of Nestin in Renal Tubular Epithelial Cells in Hypercholesterolemic Rats SI Xiaoyun, WU Xiaoyan, JIA Ruhan Department of Nephrology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan (430071)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of valerian oil on expression of nestin in renal tubular epithelial cells in Hypercholesterolemic rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into the control group, the hyperlipidemia group, the valerian oil group (25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for lavage) and the simvastatin group (5 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Dietary-induced hyperlipidemia were established by given 4% cholesterol and 1% cholic acid diet for 16 weeks. Changes of serum lipid, urinary albumin, serum creatinine and renal interstitial pathological changes were assessed at the 8th, 12th and 16th week, and the expressions of nestin protein were detected by immunohistochemical stain. **Results:** As time elapsed, the expression of nestin and α-SMA in renal tubular epithelial cells were increased significantly. There was positive correlation among the expression of nestin and total cholesterol, low density lipoprotein, urinary albumin and serum creatinine ($r=0.963, 0.830, 0.944, 0.706, P<0.01$). Nestin also had a positive correlation with tubular-interstitial index ($r=0.974, P<0.01$) and α-SMA ($r=0.804, P<0.01$). The serum levels of total cholesterol, low density lipoprotein, urinary albumin and serum creatinine were significantly decreased in the valerian oil group than that in hyperlipidemia group, accompanied with reduced expression of nestin and α-SMA in renal tubular epithelial cells ($P<0.01$). Followed the decreased nestin expression, the renal interstitial injury and fibrosis were relieved significantly in the valerian oil group than in the hyperlipidemia group. The effect was better than that in the simvastatin group ($P<0.05$). **Conclusion:** It is concluded that valerian oil has the protective effects on renal interstitial fibrosis by decreasing serum lipid, down-regulation the expression of nestin protein in Hypercholesterolemic rats.

KEY WORDS Valerian Hypercholesterolemia Renal interstitial fibrosis Nestin

巢蛋白是一种属于中间丝的细胞骨架蛋白,主要表达于未分化、具有分裂能力的细胞,曾被广泛用作干细胞的标志性蛋白,能选择性表达于人类高度分化的肾小球足细胞。近年来,进一步的研究发现,除足细胞外,损伤的肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞和

肾间质也出现巢蛋白的异常表达^[1],但其作用机制尚不清楚,可能与细胞表型转化密切相关。缬草为败酱科缬草属的多年生野生植物,研究发现缬草油不仅能调节血脂及抗脂质过氧化,而且对脂质肾损害的进程有延缓作用^[2]。但在肾损伤过程中缬草油是否影响

① 武汉大学中南医院肾内科 (武汉 430071)
② 武汉大学人民医院肾内科 (武汉 430060)

巢蛋白表达目前尚少见文献报道。我们拟观察缬草油对高胆固醇血症大鼠肾小管上皮细胞巢蛋白表达的影响,以进一步探讨缬草油肾保护作用的可能机制。

材料与方 法

1 试剂与药品 胆固醇,武汉亚法生物技术公司;胆酸钠,北京化学试剂公司;鼠抗巢蛋白(Nestin)抗体、鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体,福州迈新公司。链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒,SP Kit,福州迈新公司;缬草油:采集神农架林区的宽叶缬草(*Valeriana officinalis* L. var. *Latifolia* Miq.)鲜根制成的乳白色液体,每毫升含缬草挥发油 5 mg(华中科技大学同济医学院老年医学研究所薛存宽教授惠赠)。

2 模型制备与动物分组 12 周龄清洁级雌性 SD 大鼠 96 只,由武汉大学实验动物中心提供。随机分为 4 组:正常组、高脂组、缬草油($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组和辛伐他汀($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组,每组 24 只。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(饲料的可溶性蛋白含量为 25%,脂肪含量 19.3%),供高脂组、缬草油组、辛伐他汀组大鼠自由进食,正常组大鼠进食普通饲料。缬草油组和辛伐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)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。分别于第 8、12 和 16 周分批处死动物。

3 观察指标

3.1 血脂、尿蛋白及肾功能测定 (1)总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)、血肌酐(Scr)均采用 Beckman 自动生

化分析仪检测。(2)24 h 尿蛋白定量(UPE):代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,用磺基水杨酸法检测尿蛋白。

3.2 肾小管间质病理改变 将 10% 中性福尔马林固定的肾组织常规石蜡包埋切片,行 PAS 染色。每张标本高倍镜下顺序观察 50 个视野,按肾小管扩张、萎缩、间质细胞浸润和纤维化程度等将肾小管间质损伤分为 IV 级,0 级:小管间质正常;I 级:小管间质病变散在轻微,范围 < 15%;II 级:病变呈灶性或小片性分布,范围 $\geq 15\%$, < 50%;III 级:病变呈片状或弥漫分布,范围 $\geq 50\%$;计数视野内积分,取均值作为肾小管间质损伤指数。

3.3 免疫组织化学染色 $3 \mu\text{m}$ 切片常规脱蜡至水,SP 法检测肾小管上皮细胞 Nestin 和 α -SMA 蛋白表达,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。结果判断采用半定量法,连续观察 50 个 400 倍视野,根据肾间质染色强弱、染色范围分为 0、1、2、3 级。计数视野内积分,取均值。

4 统计学方法 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,SPSS 13.0 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。

结 果

1 血脂、尿蛋白和肾功能 16 周时缬草油组和辛伐他汀组血 TC 和 LDL 较高脂组明显降低($P < 0.01$),以辛伐他汀组降低为甚,但两组间差异无统计学意义。TG 和 HDL 各组间治疗前后无明显变化。缬草油组和辛伐他汀组 UPE 和 Scr 较高脂组显著下降,以缬草油组下降更显著($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 16 周末各组大鼠血脂、尿蛋白和肾功能比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL(mmol/L)	HDL(mmol/L)	Scr($\mu\text{mol/L}$)	UPE(mg/24 h)
正常组	1.43 \pm 0.16	0.67 \pm 0.31	0.39 \pm 0.08	0.43 \pm 0.13	48.26 \pm 5.15	7.35 \pm 1.18
高脂组	6.56 \pm 1.11	0.89 \pm 0.26	2.68 \pm 0.77	0.41 \pm 0.06	75.58 \pm 11.13	25.74 \pm 5.05
缬草油组	2.99 \pm 0.36**	0.94 \pm 0.25	1.15 \pm 0.14**	0.46 \pm 0.14	57.94 \pm 6.28**	11.09 \pm 2.15***
辛伐他汀组	2.62 \pm 0.24**	0.78 \pm 0.29	0.95 \pm 0.11**	0.44 \pm 0.11	61.87 \pm 6.31**	14.15 \pm 2.76**

注:与高脂组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与辛伐他汀组比较,# $P < 0.05$ (下同)

2 肾小管间质病理改变 正常组肾小管间质结构清楚,未见细胞浸润。高脂组 8 周和 12 周时肾小管出现灶状萎缩,部分有代偿性肥大,肾间质多灶状单个核细胞浸润,间质内基质成分明显增多;16 周时肾小管多灶状萎缩,肾间质弥漫性单个核细胞浸润,出现间质纤维化,肾小管间质损伤指数增高。缬草油组和辛伐他汀组肾小管偶见灶状萎缩和代偿性肥大,肾间质内散在小灶状单个核细胞浸润,基质增生和纤维化少见,肾小管间质损伤指数显著下降,以缬草油组改善更明显。见表 2,图 1。

3 免疫组化 正常组 Nestin 蛋白选择性表达于肾小球,肾小管间质未见到阳性细胞。高脂组 8 周时,除肾小球外,肾间质出现 Nestin 散在表达;12 周时高脂组肾小管上皮细胞和肾间质 Nestin 表达逐渐增多;16 周时肾小管上皮细胞 Nestin 蛋白显著表达,以近端肾小管细胞为主,涉及部分远端小管和集合管。缬草油组肾小管上皮细胞 Nestin 蛋白表达较高脂组明显减弱,辛伐他汀组表达有所减弱。见表 2,图 2。

以血管作为自身阳性内参照,正常组肾小管上皮细胞内偶见散在 α -SMA 阳性细胞;高脂组肾小管上

皮细胞内 α -SMA 表达增加, 随时间延长, α -SMA 表达逐渐增多; 缬草油组和辛伐他汀组肾小管上皮细胞 α -SMA 表达较高血脂组明显减弱。见表 2, 图 3。

表 2 各组大鼠病理学改变和巢蛋白表达 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	肾小管间质损伤指数	Nestin 蛋白	α -SMA 蛋白	
正常组	8 周	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01
	12 周	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.03
	16 周	0.14 ± 0.07	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.01
高血脂组	8 周	1.42 ± 0.11	0.99 ± 0.15	0.14 ± 0.07
	12 周	1.83 ± 0.14	1.26 ± 0.12	1.37 ± 0.11
	16 周	2.09 ± 0.31	1.47 ± 0.09	1.86 ± 0.19
缬草油组	8 周	0.53 ± 0.07**	0.46 ± 0.16**	0.11 ± 0.08
	12 周	0.47 ± 0.11***	0.51 ± 0.15***	0.57 ± 0.08**
	16 周	0.78 ± 0.12***	0.84 ± 0.13***	0.77 ± 0.20***
辛伐他汀组	8 周	0.72 ± 0.13**	0.78 ± 0.06	0.15 ± 0.03
	12 周	0.95 ± 0.09**	0.88 ± 0.08*	0.73 ± 0.10*
	16 周	1.26 ± 0.15**	1.04 ± 0.12**	1.15 ± 0.18*

讨 论

巢蛋白归为第 IV 类中间丝蛋白, 分布在细胞浆内, 主要维持前体细胞正常的形态结构, 也可与其他中间丝蛋白共聚组装成中间丝发挥细胞骨架作用。在肾脏的发育过程中, 巢蛋白一过性表达于肾小球毛细血管前体细胞、以及间充质来源的前体细胞。本研究中, 大鼠接受高脂饮食 16 周后, 在血脂和尿蛋白升高同时, 肾小管上皮细胞出现巢蛋白显著表达, 证实脂质肾损害过程中损伤的肾小管上皮细胞也能够表达巢蛋白。

异常表达的巢蛋白在肾损伤中的作用并不清楚。有研究发现, 巢蛋白表达上调可能与细胞表型转化密切相关。在抗 Thy1 肾炎模型中, 损伤的肾小球系膜细胞大量表达巢蛋白, 表达巢蛋白的系膜细胞同时表达肌成纤维细胞标志 α -SMA 并大量增殖, 这种效应能被巢蛋白 siRNA 完全阻断^[3]。Patschan 等^[4]建立巢蛋白-绿色荧光蛋白转基因鼠急性缺血再灌注肾损伤模型, 发现缺血再灌注后巢蛋白(+)细胞由肾髓质向皮质逐渐转移, 在皮质小管间质中表达明显增加, 获得内皮细胞表型 Tie-2 并参与血管再生和缺血修复。Aan 等^[5]在慢性环孢素 A 肾损伤中发现, Nestin 蛋白呈时间依赖性表达于肾皮质, 与肾间质纤维化显著相关, 表达巢蛋白的上皮细胞缺失表达上皮细胞表型水通道蛋白-1 和钙结合蛋白 D28K。Sakairi 等^[6]的研究也发现, 单侧输尿管梗阻模型中, 巢蛋白能显著表达于损伤的肾小管上皮细胞, 与肾间质纤维化正相关; 巢蛋白阳性的小管上皮细胞不表达上皮标志 E 选择素, 而几乎均表达波形蛋白、热休克蛋白 47 和 α -SMA, 获得间充质表型; 研究同时发现, 不是所有表达波形蛋白和 α -SMA 的细胞均能表达巢蛋白, 推测巢蛋白可能成为传统转分化指标之外能

够反映小管间质损伤的新指标之一。本研究中, 随时间延长, 高脂大鼠肾小管上皮细胞 α -SMA 表达逐渐增加, 证实脂质肾损害过程中存在小管上皮转分化; 在 α -SMA 表达升高同时, 巢蛋白表达显著上调; 相关分析显示巢蛋白不仅与 α -SMA 之间显著正相关 ($r=0.804, P<0.01$), 而且与高血脂症、蛋白尿及肾间质纤维化之间显著正相关 ($r=0.963, 0.944, 0.974$, 均 $P<0.01$), 推测升高表达的巢蛋白不仅参与小管上皮-肌成纤维细胞转分化, 而且可能在肾间质纤维化的发生发展中起重要作用。

缬草主要含有环烯醚萜、倍半萜、生物碱和黄酮四大类型化学成分。缬草的主要有效部位在缬草鲜根萃取的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分, 但具体有效成分尚不清楚^[7]。我们既往的研究发现, 缬草提取物能调节血脂及抗脂质过氧化, 改善高脂大鼠肾间质纤维化^[2]。本研究发现, 高脂大鼠接受缬草油治疗后, 总胆固醇和低密度脂蛋白较高脂组明显下降, 伴尿蛋白和血肌酐明显降低。在血脂和肾功能改善同时, 肾小管上皮细胞巢蛋白表达明显减少, 其改善作用较临床常用降脂药辛伐他汀更显著。病理学检查发现, 在巢蛋白表达下调同时, 缬草油组肾小管间质损伤指数较高血脂组显著下调, 肾间质纤维化减轻。我们推测, 缬草油除有效降脂外, 尚可能通过下调肾小管上皮细胞巢蛋白表达而减轻肾间质纤维化, 从而延缓高胆固醇血症肾硬化进程。

(本文图见插页 1-3)

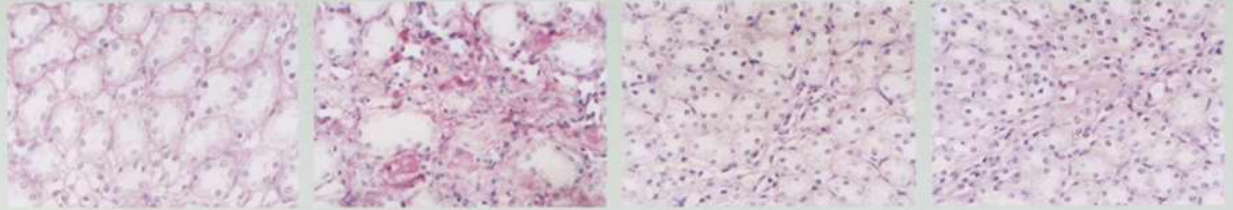
参 考 文 献

1. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, et al. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(11): 2150-2158.
2. 司晓芸, 吴小燕, 贾汝汉. 缬草油对高胆固醇血症大鼠肾间质纤维化的改善作用及机制探讨. *临床肾脏病杂志*, 2009, 9(8): 373-376.
3. Daniel C, Albrecht H, Ludke A, et al. Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation. *Lab Invest*, 2008, 88(4): 387-397.
4. Patschan D, Michurina T, Shi HK, et al. Normal distribution and medullary-to-cortical shift of nestin-expressing cells in acute renal ischemia. *Kidney Int*, 2007, 71(8): 744-754.
5. Aan KO, Li C, Lim SW, et al. Infiltration of nestin-expressing cells in interstitial fibrosis in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*, 2008, 86(4): 571-577.
6. Sakairi T, Hironuma K, Yamashita S, et al. Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int*, 2007, 72(3): 307-318.
7. 陈玲, 贾汝汉, 丁国华, 等. 缬草油对 2 型糖尿病大鼠肾脏氧化应激和蛋白激酶 C 活性的影响. *中国中西医结合肾病杂志*, 2003, 4(4): 192-195.

(收稿: 2010-03-01 修回: 2010-04-12)

缬草油对高胆固醇血症大鼠肾小管上皮细胞巢蛋白表达的影响

(见正文486页)



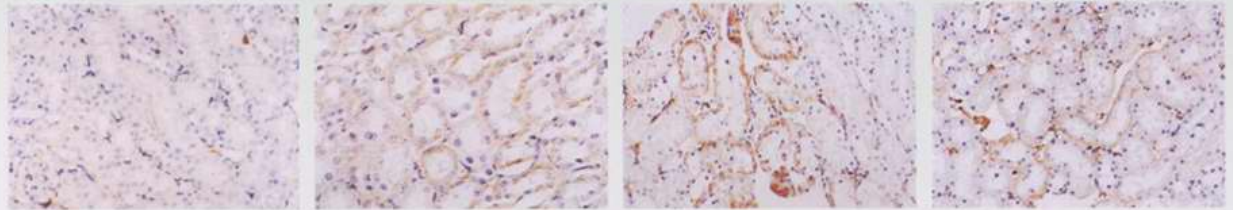
正常组

高脂组

缬草油组

辛伐他汀组

图1 各组大鼠肾小管间质病理改变 (PAS × 200)



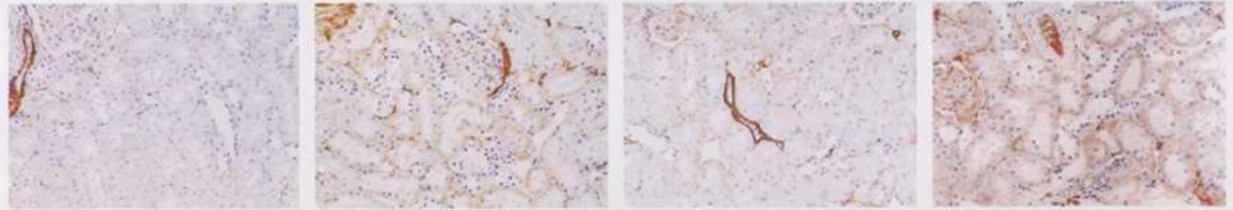
正常组

高脂组

缬草油组

辛伐他汀组

图2 各组大鼠肾小管上皮细胞巢蛋白表达情况 (SP × 200)



正常组

高脂组

缬草油组

辛伐他汀组

图3 各组大鼠肾小管上皮细胞α-SMA表达情况 (SP × 200)

温阳活血利水方对阿霉素肾病大鼠肾小球足细胞podocin表达的影响

(见正文492页)



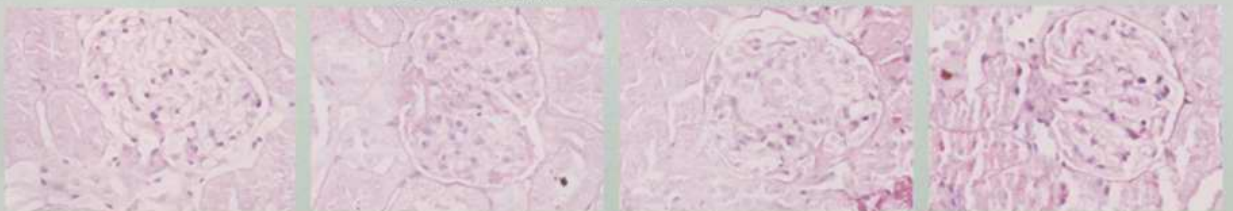
正常组

模型组

中药组

泼尼松组

图3 各组大鼠肾小球足细胞podocin蛋白表达



正常组

模型组

中药组

泼尼松组

图5 各组大鼠肾组织光镜变化 (×400)