

• 基础实验研究论著 •

金雀异黄素对肾间质纤维化大鼠氧化应激水平的影响*

郭晓超¹, 李建华^{1△}, 王志平², 苏筠霞¹, 李文冬³, 李 侃¹, 肖祖容¹, 吴 蓉¹, 李海端¹

(1. 兰州大学第一医院肾病科, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州大学第二医院, 甘肃兰州 730000; 3. 陕西省宝鸡市人民医院肾内科, 陕西宝鸡 721000)

摘 要:目的 探讨金雀异黄素抗肾间质纤维化的可能机制。方法 用单侧输尿管结扎(UUO)制作 SD 大鼠肾间质纤维化模型, 将 32 只大鼠随机分为假手术组、模型组、金雀异黄素小剂量组、金雀异黄素大剂量组, 每组 8 只。14 天后, 观察各组肾脏病理改变和肾间质纤维化程度并进行肾小管-间质纤维化积分, 测定血清胱抑素 C(Cys C)、丙二醛(MDA)的含量、总抗氧化能力(T-AOC)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)的活性。结果 金雀异黄素对干预组大鼠的肾间质纤维化有所改善, 肾小管间质损伤程度减轻, Cys C、MDA 的含量有所降低, 抗氧化能力增强, 且随剂量增加其效果愈明显(P 均小于 0.05)。结论 金雀异黄素可缓解 UUO 大鼠肾间质纤维化程度, 提示可能机制与其抗氧化作用有关。

关键词: 异黄酮素; 输尿管梗阻; 肾间质纤维化; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 应激

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0260-03

Effect of genistein on oxidation stress in rats with renal interstitial fibrosis*

Guo Xiaochao¹, Li Jianhua^{1△}, Wang Zhiping², Su Junxia¹,Li Wendong³, Li Kan¹, Xiao Zurong¹, Wu Rong¹, Li Haiduan¹

(1. Department of Nephrology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Department of

Nephrology, People's Hospital of Baoji City, Baoji, Shanxi 721000, China)

Abstract: Objective To explore therapeutic effect of genistein on unilateral ureteral obstruction(UUO) induced renal interstitial fibrosis and it's mechanism in rat. **Methods** UUO was adopted to prepare models of renal interstitial fibrosis. Thirty-two healthy male SD rats were randomly assigned to sham operation group, UUO group, low-dose genistin group and high-dose genistin group(8 rats for each group). 14 d later, the pathological change of renal tubule and interstitial were observe by HE and Masson staining, moreover, the tubuloint-erstitial fibrosis were scored. The expression of cystatin C(Cys C), malonaldehyde(MDA), total anti-oxidation competence(T-AOC) and total superoxide dismutase(T-SOD) were measured. **Results** The injury of the renal interstitial fibrosis of the rats treated by genistein was improved, the contents of Cys C and MDA were significantly decreased, meanwhile the expression of T-AOC and T-SOD increased significantly compared with control group($P < 0.05$). **Conclusion** Genistein could alleviate renal interstitial fibrosis of UUO in rats, and the possible mechanism of this phenomenon might be related to it's antioxidant effect.

Key words: isoflavones; ureteral obstruction; cysteine; proteinase; inhibitors stress

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种慢性进展性肾脏病的最终归宿。在 RIF 过程中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肾间质过度堆积, 最终可造成肾脏功能不可逆的受损。大量研究表明氧化应激在 RIF 过程中起着重要的作用, 金雀异黄素(genistein, Gen)是一种天然的异黄酮类化合物, 具有抑制酪氨酸激酶活性、抗氧化等广泛药理作用, 本实验通过建立大鼠单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruct, UUO)致 RIF 模型, 观察不同剂量 Gen 对 UUO 大鼠氧化应激指标的影响及对 RIF 的防治作用, 为临床 RIF 的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 32 只, 雄性, 体质量

(200±30)g, 由兰州大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 金雀异黄素(陕西慧科植物开发有限公司), 大鼠胱抑素 C(Cys C)ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药 32 只大鼠随机分为 4 组: 假手术(Sham)组、模型(UUO)组、Gen 小剂量(Gen-1)组、Gen 大剂量(Gen-2)组, 每组 8 只。大鼠适应性喂养 1 周, 术前 1 d 开始每天灌胃给药。Sham 组与 UUO 组每只大鼠每日给予蒸馏水 1 mL 灌胃, Gen-1 组每只大鼠给予 Gen 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, Gen-2 组每只大鼠给予 Gen 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃。

1.2.2 动物模型制备 除 Sham 组外, 其余各组制备 UUO 肾

* 基金项目: 甘肃省泌尿系疾病临床医学中心科研基金资助项目。 作者简介: 郭晓超, 女, 在读研究生, 主要从事慢性肾病的一体化治疗研究。 △ 通讯作者, E-mail: ldyylijianhua@163.com。

间质纤维化大鼠模型:3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,取右侧卧位,选左侧背部肋下 0.5 cm 为切口,打开腹腔,钝性分离并暴露左侧输尿管,用止血钳夹住中上段输尿管,在两端用丝线结扎后剪断,然后逐层缝合。Sham 组仅开腹并游离左侧输尿管,但不结扎和剪断,然后缝合腹腔。

1.2.3 标本采集 UUO 术后 14 d 断尾取血收集血清后处死各组大鼠,剖取左侧肾脏,剥离包膜,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,以 3 μm 切片,行 HE、Masson 染色。

1.3 指标观察与检测方法

1.3.1 肾脏病理学观察 肾组织切片行 HE 及 Masson 染色,光镜下观察肾皮质、间质细胞增生及纤维化改变。应用图像采集和分析系统软件(Image-pro plus 6.0),400 倍光镜下,每张切片随机选择 10 个高倍镜视野观察其病理损害。肾小管-间质病变由以下参数判定,即肾小管扩张、肾小管上皮细胞水肿、变性、坏死,间质炎性细胞浸润及间质纤维化程度。计算所有病变染色面积占视野的百分比进行半定量分级,按 0~3 分评定,计算其均值作为该标本的肾小管间质损伤指数(tubulointerstitial damage index,Tdi);0 分为正常;1 分为轻度受损,病变范围小于 25%;2 分为中度受损,病变范围 25%~50%;3 分为重度受损,病变范围大于 50%。

1.3.2 方法 用 ELISA 法检测血清 Cys C 含量;硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 含量;化学比色法测定 T-AOC 活性;黄嘌呤氧化酶法测定 T-SOD 活性。具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件分析。多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病理学观察 肉眼观察:Sham 组肾脏大小及形态正常,颜色暗红;UUO 组及 Gen 干预组左侧肾脏体积增大,颜色变浅,有囊性感,内含褐色浑浊尿液,肾实质变薄,肾盂扩张,呈“花生壳”样改变。光镜下观察:Sham 组肾小球正常,肾小管上皮细胞偶见空泡变性及灶状单核细胞浸润,小管间质无增宽;Masson 染色胶原主要位于肾小球基底膜、Bowman 囊、系膜区和肾小管的毛细血管周围,肾小管周围间质部分分布较少。UUO 组 HE 及 Masson 染色显示肾小管上皮细胞弥漫空泡变性,小管管腔扩张,部分小管萎缩、坏死,肾间质明显水肿、增宽,多灶状单核细胞弥漫浸润,胶原纤维增生明显,偶见肾小球局灶性阶段性硬化。Gen 干预组肾小管上皮细胞以变性为主,坏死少见,萎缩的肾小管数量明显减少,少量炎性细胞浸润,间质纤维化的程度较模型组有所减轻。结果见图 1~2。

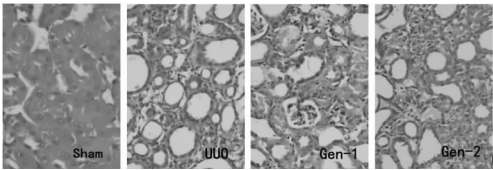


图 1 各组大鼠 HE 染色结果(×400)

各组大鼠肾小管间质损伤指数(Tdi)比较,UUO 组大鼠较 Sham 组肾小管间质损伤程度明显加重($P < 0.05$),Gen-1、Gen-2 干预组较 UUO 组相比肾小管间质损伤程度均明显减轻

($P < 0.05$),且随 Gen 剂量 Tdi 下降更明显($P < 0.05$),结果见表 1。

2.2 各组大鼠血清胱抑素 C 含量测定 与 Sham 组比较,UUO 组肾组织 Cys C 含量明显增高($P < 0.05$),Gen-1、Gen-2 组较 UUO 组 Hyp 含量均有所下降($P < 0.05$),且随 Gen 剂量增加 Cys C 含量下降更明显($P < 0.05$),结果见表 1。

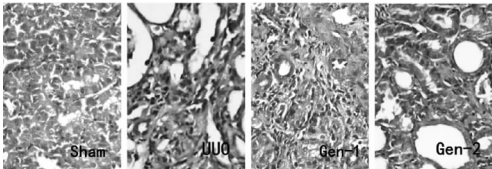


图 2 各组大鼠 Masson 染色结果(×400)

表 1 各组大鼠 Tdi、Cys C 比较

组别	Tdi	Cys C
Sham	0.25±0.07	530.18±34.07
UUO	2.25±0.14*	760.50±98.34*
Gen-1	1.90±0.11#	714.32±80.13#
Gen-2	1.75±0.09#△	650.34±85.16#△

*: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;#: $P < 0.05$,与 UUO 组比较;△: $P < 0.05$,与 Gen-1 组比较。

2.3 肾组织 T-AOC、T-SOD 活性和 MDA 含量测定 与 Sham 组比较,UUO 组 T-AOC、T-SOD 活性均降低,MDA 含量增加($P < 0.05$),与 UUO 组比较,Gen-1、Gen-2 组 T-AOC、T-SOD 活性均明显升高,MDA 含量明显下降($P < 0.05$),且随 Gen 剂量增加上述改变更明显($P < 0.05$),结果见表 2。

表 2 各组大鼠肾组织 T-AOC、T-SOD、MDA 比较

组别	T-AOC	T-SOD	MDA
Sham	1.46±0.20	12.83±0.82	2.54±0.35
UUO	0.61±0.15*	8.44±0.74*	4.72±0.53*
Gen-1	1.13±0.17#	10.71±0.77#	3.61±0.41#
Gen-2	0.84±0.18#△	9.22±0.68#△	2.83±0.37#△

*: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;#: $P < 0.05$,与 UUO 组比较;△: $P < 0.05$,与 Gen-1 组比较。

3 讨 论

RIF 可导致肾脏结构变化,与肾功能密切相关,可作为肾功能恶化的一个重要预测指标。大量研究表明,RIF 的轻重程度是决定慢性肾脏病预后的重要因素^[1-2]。因此,针对 RIF 发病过程中的关键环节进行早期干预,对慢性肾脏病的防治具有重要的意义。

慢性肾脏病患者体内普遍存在较高的氧化应激水平,与氧自由基清除系统的严重损失使得体内活性氧(reactive oxygen species,ROS)升高和抗氧化能力的失衡有关系^[3]。大量研究表明氧化应激在 RIF 过程中起重要作用。Pat 等^[4]研究显示,氧化应激标记物血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)和 8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-hydroxy-2-deoxyguanosine,8-OHdG)在 UUO 模型中显著增高,应用抗氧化剂可改善肾脏纤维化。Lin 等^[5]证实,UUO 大鼠肾组织 MDA 含量增加、热休克蛋白 70

(HSP70)表达增多、锰 SOD(MnSOD)活性下降。此外还有研究表明,氧化应激在 RIF 过程中对转化生长因子- β (TGF- β)的表达和细胞外基质(ECM)的产生发挥重要作用^[6-7]。

金雀异黄素(Genistein, Gen)即 5,7,4'-三羟基黄酮,是一种天然的酪氨酸激酶抑制剂,Gen 分子中具有 5,7,4' 位 3 个酚羟基,有一定的抗氧化活性,体内外实验显示它可以消除多种活性氧,还能提高体内抗氧化酶活性,有 SOD 样作用^[8]。近年来研究显示 Gen 对纤维化的防治也具有一定的积极作用。王浩等^[9]研究显示,Gen 可通过抑制 TGF- β 1 的表达及减少 ECM 的蓄积对 5/6 肾切除鼠肾纤维化有防治作用。

血清胱抑素 C 是从血清中分离的一种新型的半胱氨酸蛋白酶抑制剂,近年来许多学者的研究表明 Cys C 可以作为判定 RIF 的良好指标^[10-11]。MDA 是体内超氧阴离子攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发过氧化物作用的毒性终产物,是经典的、最具有代表意义的脂质氧化标志物^[3];T-AOC、T-SOD 是常见的抗氧化能力的指标。本实验通过建立 UUO 大鼠模型来观察 Gen 对 UUO 大鼠肾组织病理学改变,血清胱抑素 C 含量及氧化应激指标的影响。与 Sham 组比较,UUO 组血清 Cys C 含量与 Tdi 升高,肾组织抗氧化能力下降;与 Sham 组比较,金雀异黄素干预后血清 Cys C 含量与 Tdi 降低,肾组织抗氧化能力提高,由此表明 Gen 可减轻 UUO 大鼠肾脏氧化应激的损伤,对 RIF 具有一定的防治作用,且随着剂量的增加其效果越明显。

随着对金雀异黄素研究的不断深入,其抗纤维化作用的机制正在逐渐被揭示。金雀异黄素是已知的抗氧化剂,能通过清除氧自由基和减少氧化应激反应相关基因的表达使细胞免受活性氧的损害。康爱英等^[12]研究证实,Gen 能降低糖尿病大鼠 MDA、AGEs 含量,增加 SOD、总抗氧化能力,对肾脏具有保护作用。Gen 可能是通过下调 TGF- β 1、NF- κ B 等因子表达,延缓肾小管间质病变,进而起到肾保护作用^[13-14]。金雀异黄素可显著增加超氧化物酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽转移酶等抗氧化酶的水平,进而保护细胞免受氧化攻击。慢性肾脏病时,肾组织中晚期氧化蛋白产物(AOPPs)、晚期糖基化终产物(AGEs)、羧基化合物等大量蓄积,AOPPs 可以刺激系膜细胞活化,分泌细胞外基质,AOPPs 作用于肾小管上皮细胞,诱导其产生 Ang-Ⅱ,导致肾小管损伤和肾脏纤维化,血管紧张素转换酶抑制剂可通过抑制血管紧张素-Ⅱ的生成,延缓氧化应激损伤导致的肾间质纤维化^[15]。因此,笔者认为金雀异黄素通过抑制 NF- κ B 信号转导通路减少活性氧的产生和诱导抗氧化酶活性升高可能是其抗间质纤维化的重要机制,并且可能具有类似血管紧张素转换酶抑制剂的作用。

综上所述,氧化应激在 RIF 中发挥了重要作用,金雀异黄素可以通过减轻 UUO 大鼠氧化应激水平延缓 RIF 的进展,但具体的作用机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Evteev VA, Gasparian AV, Scherbak NP, et al. Appearance of differentiation characteristics (induction of ah-receptor-dependent genes) during cultivation of transformed cell clone K8 from embryonic rat fibroblasts[J]. Biochemistry (Mosc), 2009, 74(11): 1228-1233.
- [2] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. Kidney Int, 2006, 69(2): 213-217.
- [3] Himmelfart J, Stenvinkel P, Ikizler TA, et al. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia[J]. Kidney Int, 2002, 62(5): 1542-1538.
- [4] Pat B, Yang T, Kong C. Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants[J]. Kidney Int, 2005, 67(3): 931-943.
- [5] Lin KC, Krieg RJ, Saborio P, et al. Increased heat shock protein-70 in unilateral ureteral obstruction in rats[J]. Mol Gene Metab, 1998, 65(4): 303-310.
- [6] Yuan B, Liang M, Yang Z, et al. Gene expression reveals vulnerability to oxidative stress and interstitial of ANG Ⅱ [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284(5): 1219-1230.
- [7] 金国华, 秦晓华, 秦艳东, 等. TGF- β 1/smad 信号通路在大黄素干预人肾小管上皮细胞转分化中的作用[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(1): 36-38.
- [8] 金永生, 刘超美. 金雀异黄素的药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2002, 17(5): 190-193.
- [9] 王浩, 袁伟杰, 冯冰, 等. 金雀异黄素对 5/6 肾切除鼠肾脏的保护作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(7): 580-583.
- [10] 张耀全, 袁爱焕, 陆琴芳, 等. 血清、尿胱抑素 C 浓度可判定肾纤维化病程[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 7(1): 39-43.
- [11] 堂天凤, 郑春霞, 刘志红, 等. 小管损伤标记物在局灶节段性肾小球硬化患者中的变化及意义[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(4): 317-323.
- [12] 康爱英, 黄川锋, 王国庆, 等. 金雀异黄素对糖尿病大鼠肾脏 AGEs 和氧化应激的影响[J]. 中外健康文摘, 2009, 6(16): 215-216.
- [13] 俞东容, 杨汝春, 李建秋, 等. 防己黄芪汤对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 TGF- β 1、BMP-7 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(12): 1041-1043.
- [14] 雷文静, 聂静. 炎症在肾脏纤维化的作用及其机制[J]. 临床肾脏病杂志, 2012, 12(1): 4-6.
- [15] 孟翠萍, 罗武, 陈灵. ACEI 联合激素治疗肾病综合症疗效及 TGF- β 1 检测的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 22(2): 297-299.

(收稿日期: 2012-09-18)

欢迎投稿

欢迎订阅