

• 基础实验研究论著 •

柚皮素对单侧输尿管梗阻致肾间质纤维化大鼠 KIM-1 表达水平的影响

陈琳琳¹, 见小莉², 徐西红^{1△}

(1. 甘肃省嘉峪关市中核四〇四医院内科, 甘肃嘉峪关 735112;

2. 甘肃省嘉峪关市医药总公司, 甘肃嘉峪关 735112)

摘要:目的 观察柚皮素对单侧输尿管梗阻致大鼠肾间质纤维化肾损伤因子-1(KIM-1)表达水平的影响。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(UUO 组)、柚皮素组(Nar 组), 每组 8 只。UUO 组及 Nar 组行左侧输尿管结扎术, Sham 组只游离但不结扎和剪断输尿管。造模后分别给予生理盐水、柚皮素 25 mg/(kg·d)。14 d 后处死大鼠, 处死前收集 24 h 尿液, ELISA 法检测大鼠尿液 KIM-1 水平, 取梗阻侧肾制作标本, 行 HE 及 Masson 染色, 光镜下观察肾间质纤维化程度并半定量对肾小管间质损伤指数进行积分; 免疫组化法检测肾间质 KIM-1 的表达。结果 与 Sham 组比较, UUO 组肾小管间质损伤指数(TDI)升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 尿液、肾组织中 KIM-1 水平均升高, 差异也有统计学意义($P < 0.05$)。与 UUO 组比较, Nar 组 TDI 降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 尿液、肾组织中 KIM-1 水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析示 24 h 尿液及肾组织 KIM-1 水平与 TDI 呈正相关(r 分别为 0.862、0.866, P 均小于 0.01)。结论 柚皮素可减轻肾间质纤维化, 降低 KIM-1 的表达。

关键词:柚皮素; 肾间质纤维化; 肾损伤因子-1; 输尿管梗阻

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)11-1384-03

Effect of naringenin on KIM-1 expression in rats with renal interstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction

Chen Linlin¹, Jian Xiaoli², Xu Xihong^{1△}

(1. Department of Internal Medicine, China Nuclear Industrial 404 Hospital, Jiayuguan, Gansu 735112, China;

2. Jiayuguan Pharmaceutical Corporation, Jiayuguan, Gansu 735112, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of naringenin on KIM-1 expression in rats with renal interstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction(UUO). Methods 24 SD male rats were randomly divided into Sham group, UUO group and naringenin group(Nar group), respectively. Rats in UUO group and Nar group got UUO to establish renal interstitial fibrosis models. Rats in Sham group only free but not ligated and cut ureters. Rats were administered saline and naringenin 25 mg/(kg·d) for 14 days. Then, 24 h urine samples were collected before the rats were killed, and KIM-1 in these samples were measured by ELISA. Specimens were obtained from obstructive renal, the pathological change of renal tubule and interstitial were observe by HE and Masson staining. Moreover, the tubulointerstitial damage index was scored and the expression of KIM-1 in renal tissue was examined by immunohistochemical staining. Results Compared with Sham group, the tubulointerstitial damage index of UUO group significantly increased($P < 0.05$), contents of KIM-1 in urine and renal tissues also significantly increased($P < 0.05$). Compared with UUO group, the tubulointerstitial damage index score of Nar group alleviated($P < 0.01$), contents of KIM-1 in urine and renal tissues also reduced($P < 0.05$). Correlation analysis showed that there was positive correlation between KIM-1 in urine and renal tissues and TDI($r=0.862, 0.866, P < 0.01$). Conclusion Naringenin can relieve renal interstitial fibrosis and reduce the content of KIM-1.

Key words: naringenin; renal interstitial fibrosis; KIM-1; ureteral obstruction

肾间质纤维化是各种原因所致的肾脏疾病慢性进展, 最终导致肾衰竭的共同机制^[1], 研究表明, 肾间质纤维化与肾功能的相关性比肾小球硬化与肾功能的相关性更为密切。肾损伤因子-1(KIM-1)是肾脏近曲小管上皮细胞上的一种跨膜蛋白, 是反映肾功能变化的重要细胞因子, 既往研究表明其对急性肾损伤有着极其重要的临床意义^[2-3]。近研究表明, KIM-1 对于反映肾间质纤维化导致的慢性肾损伤具有重要临床意义^[4]。本研究应用单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠建立肾间质纤维化模型, 观察柚皮素对单侧输尿管梗阻致大鼠肾间质纤维化 KIM-1 表达水平的变化, 为肾间质纤维化的早期诊断及治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 24 只(兰州大学基础医学院动物中心提供), 体质量(200±20)g。

1.2 仪器与试剂 兔抗鼠 KIM-1 一抗, SP 免疫组织化学试剂盒, 大鼠 KIM-1 定量 ELISA 试剂盒均由武汉博士德(Boster)生物有限公司提供; 柚皮素由上海瑞齐生物科技有限公司提供。

1.3 造模与分组 将 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(UUO 组)及柚皮素组(Nar 组), UUO 组及 Nar 组行单侧输尿管结扎术致肾间质纤维化大鼠模型; 10%水合氯醛(3 μg/g 腹腔注射麻醉大鼠, 左肾下极处游离并结扎左输尿管建立 UUO 模型, 假手术组开腹后仅游离左输尿管。造模后分别给予生理盐水, 柚皮素 25 mg/(kg·d)灌胃。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 肾组织病理光镜检查 术后 14 d 处死大鼠后, 取左侧肾组织用 10%中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 以 3 μm 的石蜡切片行 HE、Masson 染色。半定量评估肾小管间质损伤

指数(TDI);0分为正常;1分为轻度受损,肾小管上皮细胞呈灶性轻度萎缩、变性,少量散在炎性细胞浸润,纤维组织增生少量分布,病变范围小于25%;2分为中度受损,肾小管上皮细胞中度萎缩、变性,中量炎性细胞浸润,纤维组织中度增生病变,范围25%~50%;3分为重度受损,肾小管上皮细胞萎缩、变性和坏死重,呈片状分布,大量弥漫的炎性细胞浸润,纤维组织增生呈束状、多灶或网状成片,病变范围大于50%。光镜下观察肾脏组织皮质区肾小管及间质的结构及变化。

1.4.2 ELISA 法检测大鼠 24 h 尿液 KIM-1 的水平 处死大鼠前 1 天将大鼠分别置于代谢笼中,禁食、自由饮水,收集 24 h 尿液,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 KIM-1 的水平,具体操作按试剂盒操作。

1.4.3 免疫组织化学法检测肾组织 KIM-1 的表达 采用 SP 法检测肾组织 KIM-1 的表达,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗,3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,PBS 冲洗,15%胎牛血清去除一抗中的非特异结合位点,滴加一抗,冰箱孵育过夜,滴加生物素标记的二抗,37℃孵育 30 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,室温孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 染色,苏木素复染,自来水冲洗 5 min 后封片。光学显微镜观察 KIM-1 的表达情况,染成棕黄色者为阳性,每张切片随机选取 5 个高倍视野(200×),运用 Image-proplus 6.0 图像分析系统进行半定量检测,用平均光密度(MOD)值表示 KIM-1 的相对水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,两变量相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 柚皮素对大鼠肾组织 HE 和 Masson 染色结果的影响 HE 染色 Sham 组肾小球及肾小管间质正常;UUO 组肾小管上皮细胞肿胀,多数肾小管扩张,间质多灶状单核细胞浸润和纤维化;Nar 组间质内炎性细胞呈小灶性浸润,少许上皮细胞肿胀,部分肾小管轻度扩张,肾间质纤维化较 UUO 组减轻,见图 1。Masson 染色 Sham 组胶原染色主要位于肾小球基膜、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则较少;UUO 组可见肾间质大量胶原纤维增生,间质胶原纤维呈蓝色染色,间质纤维化呈灶状分布;Nar 组间质纤维化程度减轻。与 Sham 组比较,UUO 组 TDI 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),Nar 组与 UUO 组相比,TDI 降低,差异也有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.2 柚皮素对大鼠 24 h 尿液 KIM-1 水平的影响 与 Sham 组比较,UUO 组大鼠 24 h 尿液 KIM-1 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),柚皮素干预后,KIM-1 水平较 UUO 组有所减低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但仍高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

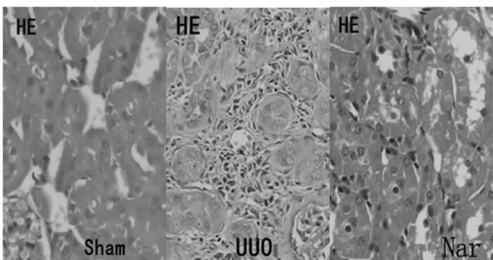


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色结果(200×)

2.3 柚皮素对大鼠肾组织 KIM-1 的表达的影响 Sham 组大

鼠肾小管上皮细胞胞质、肾小球脏层上皮细胞和内皮细胞、间质血管壁表达量少,着色稀疏;与 Sham 组比较,UUO 组肾小管上皮细胞胞质中表达明显增多,呈不均匀颗粒状,且与局部炎细胞浸润、间质增宽及肾小管损伤程度一致($P < 0.05$);Nar 组表达较 UUO 组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),但仍高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 及图 2。

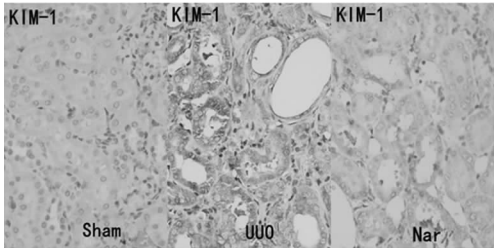


图 2 各组大鼠肾组织 KIM-1 免疫组化结果(200×)

表 1 各组大鼠 TDI 和尿液、肾组织 KIM-1 水平比较

组别	TDI	24 h 尿液	肾组织 KIM-1
		KIM-1 水平(mg/L)	相对表达量(MOD)
Sham 组	0.38±0.5	14.93±4.20	0.21±0.14
UUO 组	2.38±0.74☆	53.70±9.88★	0.66±0.11☆
Nar 组	1.5±0.93▲	29.49±7.16☆△	0.35±0.12☆▲

☆: $P < 0.05$; ★: $P < 0.01$, 与 Sham 组比较; △: $P < 0.05$; ▲: $P < 0.01$, 与 UUO 组比较。

2.4 KIM-1 与 TDI 的相关性分析 UUO 组 TDI 较 Sham 组升高,尿液、肾组织 KIM-1 相对表达量也增加。柚皮素干预后,TDI 与 KIM-1 呈同方向性降低。相关性分析发现,TDI 与尿液 KIM-1 的水平呈正相关($r = 0.862, P < 0.01$);TDI 与肾组织 KIM-1 相对表达量呈正相关($r = 0.866, P < 0.01$)。

3 讨 论

随着人们生活水平提高和生存压力增大而导致的不良生活方式以及人口老龄化、糖尿病、高血压、代谢综合征等的增多,慢性肾脏疾病发病率逐年上升,慢性肾脏病已经成为当今威胁人类健康的重要疾病。而与危害人类健康的其他重大疾病,例如心脑血管病相比,慢性肾脏病的临床表现较隐匿,患者知晓率低^[5]。因此,需要简单、方便的实验室指标用于肾脏病的诊断。肾间质纤维化是各种原因所致的肾脏疾病慢性进展,最终导致肾衰竭的共同机制,其主要病理基础是细胞外基质(ECM)代谢失衡,ECM 堆积,最终导致纤维化形成^[6]。研究表明,肾间质纤维化的程度比起肾小球硬化与肾功能的相关性更为密切^[7]。因此早期评估肾间质纤维化程度对于肾脏疾病的诊断与治疗具有重要意义。

本实验 UUO 组大鼠梗阻侧肾组织 HE 染色肾小管上皮细胞弥漫空泡变性,多数肾小管扩张、萎缩,间质多灶状单核细胞浸润和纤维化,Masson 染色可见肾间质大量胶原纤维增生,半定量评估肾小管间质损伤指数升高,由此可见,UUO 动物模型是研究肾间质纤维化的理想模型。

KIM-1 是一种表达于肾小管上皮细胞的免疫调节蛋白,Hoffmann 等^[8]研究证实,在急性肾损伤患者中,KIM-1 的升高早于肌酐、尿素氮水平,可早期判断肾功能受损情况。既往研究发现,在马兜铃酸诱导肾小管上皮细胞损伤中,KIM-1 于 24 h 分泌达高峰,并且持续 48 h,对于肾小管损伤的检测具有重要意义^[9]。闫静^[10]研究发现,在糖尿病肾病患者中,KIM-1 检测的阳性率高于微量蛋白尿,提示 KIM-1 是早期预测糖尿

病肾病的新指标。本研究证实 UO 组, 24 h 尿液 KIM-1 的水平、肾组织 KIM-1 的相对表达量与肾小管间质损伤指数呈同方向性变化, 相关性分析示 24 h 尿液及肾组织 KIM-1 的水平与 TDI 呈正相关, KIM-1 除了早期预测急性肾损伤, 有望成为早期预测肾间质纤维化损伤的新指标。本研究发现, 24 h 尿液 KIM-1 的水平与肾组织 KIM-1 的相对表达量呈同向性变化, 并且均与 TDI 呈正相关, 尿液标本具有留取方便, 无创性等优点, 成为各项实验室检查的常用标本之一, 因此可以选用 24 h 尿液 KIM-1 水平来间接反映肾组织 KIM-1 的表达量, 从而判断肾间质纤维化的病情进展, 为早期、方便评估肾脏疾病进展提供新的诊断思路。

柚皮素是一类天然黄酮类化合物, 具有调节血压、降低血糖、调节血脂、抗菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞生长等广泛药理作用^[11], 既往研究证实, 柚皮素对于乙醇诱导的肝脏纤维化有一定的抑制作用^[12]。本实验发现柚皮素可抑制 KIM-1 在 UO 大鼠尿液及肾组织的表达, 延缓肾小管损伤及间质纤维化的进展。

综上所述, 肾间质纤维化时尿液和肾组织中 KIM-1 的表达同向性增多, 尿液 KIM-1 有望成为早期、方便检测肾间质纤维化的新的生物学标志物, 柚皮素对于肾间质纤维化有一定的抑制作用, 但其确切分子机制尚有待于进一步研究。

参考文献

[1] Yamaguchi I, Tchao BN, Burger ML, et al. Vascular endothelial cadherin modulates renal interstitial fibrosis[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2012, 120(1): e20-31.

[2] Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, et al. Expression of kidney injury molecule-1(Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238(3): 306-314.

[3] Vinken P, Starckx S, Barale-Thomas E, et al. Tissue Kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(7): 1049-1062.

[4] 王芳, 张岩, 庄垟垟, 等. 雷帕霉素对双侧输尿管梗阻再通大鼠肾脏的保护作用[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(3): 45-49.

[5] 陈香美, 王海燕. 提高慢性肾脏病的知晓率、治疗率和控制率减轻对国民健康的危害[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(6): 441-442.

[6] Xiao HB, Liu RH, Ling GH, et al. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF- β 1; 1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(5): 757-765.

[7] Kinugasa F, Noto T, Matsuoka H, et al. Prevention of renal interstitial fibrosis via histone deacetylase inhibition in rats with unilateral ureteral obstruction[J]. *Transpl Immunol*, 2010, 23(1/2): 18-23.

[8] Hoffmann D, Bijol V, Krishnamoorthy A, et al. Fibrinogen excretion in the urine and immunoreactivity in the kidney serves as a translational biomarker for acute kidney injury[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(3): 818-828.

[9] 孙骅, 刘志红, 王生余, 等. 马兜铃酸诱导肾小管上皮细胞损伤中 Ngal 和 Kim-1 的变化及其意义[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2007, 16(4): 340-344.

[10] 同静. 联合检测尿 KIM-1, mALB, β 2-MG 在 2 型糖尿病早期肾损伤诊断中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(13): 1578-1579.

[11] 杨宏亮, 田珩, 李沛波, 等. 柚皮苷及柚皮素的生物活性研究[J]. *中药材*, 2007, 30(6): 752-754.

[12] Jayaraman J, Jesudoss VA, Menon VP, et al. Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2012, 22(7): 568-576.

(收稿日期: 2014-01-12)

(上接第 1383 页)

参考文献

[1] Yen SL, Chiu TY, Lin YC, et al. Obesity and hepatitis B infection are associated with increased risk of metabolic syndrome in university freshmen[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2008, 32(3): 474-480.

[2] Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, et al. Elevated basal PI₃-kinase activity and reduced insulin signalling in sucrose-induced hepatic insulin resistance[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(1): 170-176.

[3] Myer MG Jr, Sun XJ, White MF. The IRS-1 signaling system[J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(7): 289-293.

[4] Wiedmann M, Tamaki S, Silberman R, et al. Constitutive over-expression of the insulin receptor substrate-1 causes functional up-regulation of Fas receptor[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(6): 803-810.

[5] Ham YM, Mahoney SJ. Compensation of the AKT signaling by ERK signaling in transgenic mice hearts overexpressing TRIM72[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(10): 1451-1462.

[6] Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture[J]. *Brain Res*, 1977, 126(3): 397-442.

[7] Banker GA, Cowan WM. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture[J]. *J Comp Neurol*, 1979, 187(3): 469-493.

[8] Zhu L, Tong G, Chen J, et al. Cloning and identification of a novel

RNF6 transcriptional splice variant Spg2 in human development[J]. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51(4): 302-307.

[9] Xu K, Shimelis H, Linn DE, et al. Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(4): 270-282.

[10] Rome S, Meugnier E, Vidal H. The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7(3): 249-254.

[11] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.

[12] Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin mediated protein degradation[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(1): 1-11.

[13] Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(5): 606-616.

[14] Rhodes CJ. Type 2 diabetes a matter of beta cell life and death[J]. *Science*, 2005, 307(5708): 380-384.

[15] Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation[J]. *Diabetes*, 2001, 50(1): 24-31.

(收稿日期: 2014-01-12)