

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

司晓芸¹, 贾汝汉², 黄从新², 丁国华², 刘红燕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, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 目的 探讨宽叶缬草对高胆固醇血症大鼠肾组织内转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 表达的影响及其意义。方法 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, 以及对肾小球细胞外基质增生、TGF- β_1 和 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、尿蛋白和血肌酐的作用, 肾病理和免疫组化证实宽叶缬草在降脂同时, 能减轻肾小球系膜病变和细胞外基质产生, 降低肾组织内 TGF- β_1 和 IV 型胶原表达。结论 宽叶缬草对高脂血症肾脏有保护作用, 此作用可能与其降低肾组织内 TGF- β_1 表达有关。

[关键词] 宽叶缬草; 高胆固醇血症; 肾组织; 转化生长因子 β_1

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-530X(2003)09-0845-05

近年来, 高脂血症对肾病的影响已日益引起人们的重视, 但脂源性肾病的发生发展机理尚不是很清楚。肾小球硬化是各种慢性肾小球疾病走向终末期的共同途径, 而细胞外基质 (ECM) 的病理性积聚是肾小球疾病进展的主要特征, 是发展肾小球硬化和晚期肾脏病的结构基础^[1]。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 为一类多肽生长因子, 它可使 ECM 过度产生并抑制其降解, 增加细胞对 ECM 的粘附, 同时调节其他生长因子的作用, 被认为是导致肾硬化的关键性因素之一^[2], 其在脂质肾损害中的作用已在许多研究中得到证实。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^[3]。我们观察了实验性高胆固醇血症大鼠采用宽叶缬草治疗后肾组织内 TGF- β_1 、IV 型胶原的表达和 ECM 改变, 旨在探讨宽叶缬草在脂质肾损害中的可能肾保护作用及其可能机制。

1 材料与方 法

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 *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 (湖北省老年病研究所薛存宽教授惠赠)。兔抗 TGF- β_1 多克隆抗体和鼠抗 IV 型胶原单克隆抗体 (购自武汉博士德公司)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒 (SP Kit 购自福州迈新公司)。

1.3 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 3 组: 高脂组、缬草组和正常组 (均 $n=8$)。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 (脂肪含量 19.3%), 供高脂组和缬草组大鼠自由进食, 正常组大鼠进食普通饲料。缬草组大鼠在进食高脂饲料同时, 每日给予宽叶缬草提取物 (缬草挥发油剂量 25 mg·kg⁻¹·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。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 血清生化指标、肾功能和尿蛋白测定 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): 采用 Beckman 自动生化分析仪检测; 血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN): 采用 Beckman 自动生化分析仪测定; 24 h 尿蛋白定量 (UPE): 代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 采用磺基水杨酸

[收稿日期] 2002-12-12

[基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目 (99J142)

[通讯作者] 贾汝汉 Tel (027) 88041919-2149

法检测。

1.4.2 肾脏病理学观察 用 1% 戊巴比妥钠 (30 mg · kg⁻¹) 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。光镜检查: 切片厚 3 μm, 行过碘酸雪夫氏反应 (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)。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, 0.125% 胰蛋白酶消化 20 min, 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。肾小球免疫组化结果采用 HPIAS-1000 高清晰度医学彩色病理图像分析系统行半定量分析, 每份标本测 10 个肾小球, 用积分吸光度 (ILD) 表示阳性物质的相对含量。肾小管间质显色结果判断采用半定量法, 连续观察 50 个 400 倍视野, 根据染色强弱、染色范围分为 0, 1, 2, 3 级, 计数视野内积分, 取均值。

1.5 统计学处理 运用 SPSS10.0 for Windows 统计软件分析处理计量资料, 结果以均数 ± 标准差表示, 以 P < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 宽叶缬草对血脂、尿蛋白和肾功能的影响 高脂组大鼠血清总胆固醇及低密度脂蛋白浓度显著高于缬草组和正常组 (P < 0.01), 缬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)。甘油三脂和高密度脂蛋白 3 组间差异不显著 (P > 0.05, 表 1)。高脂组大鼠血肌酐和尿蛋白较缬草组和正常组明显增高 (P < 0.01), 缬草组大鼠尿蛋白高于正常组 (P < 0.05)。血尿素氮高脂组较缬草组和正常组有所升高, 但 3 组间无统计学差异 (表 2)。

表 1 3 组大鼠血脂结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	TC/mm ³ · L ⁻¹	TG/ mmol · L ⁻¹	HDL/ mmol · L ⁻¹	LDL/ mmol · L ⁻¹
高脂组	5.18 ± 1.06 ²⁾	0.89 ± 0.26	0.41 ± 0.06	1.99 ± 0.57 ²⁾
缬草组	2.89 ± 0.39 ⁴⁾	0.94 ± 0.25	0.46 ± 0.14	0.97 ± 0.09 ²⁾
正常组	1.01 ± 0.28	0.67 ± 0.31	0.43 ± 0.13	0.32 ± 0.07

注: 与正常组比较 ¹⁾P < 0.05 ²⁾P < 0.01 与高脂组比较

³⁾P < 0.05 ⁴⁾P < 0.01 (表 2, 3 同)

万方数据

表 2 3 组大鼠尿蛋白和肾功能结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	UPE/mg · 24h ⁻¹	Scr/μmol · L ⁻¹	BUN/mmol · L ⁻¹
高脂组	21.94 ± 3.00 ²⁾	67.81 ± 12.83 ²⁾	6.84 ± 1.29
缬草组	11.31 ± 2.34 ⁴⁾	50.56 ± 10.61 ³⁾	6.46 ± 1.28
正常组	6.85 ± 2.98	44.68 ± 8.08	6.30 ± 0.60

2.2 肾脏病理改变

2.2.1 光镜 正常组大鼠肾小球未见异常改变 (图 1)。高脂组大鼠多数肾小球呈系膜基质中重度增多, 基底膜中重度不规则增厚, 肾小球局部可有空泡形成, 偶见肾小球局灶节段性硬化 (图 2)。缬草组大鼠肾小球系膜基质增多明显减轻 (图 3), 肾小球系膜基质指数明显低于高脂组 (表 3)。

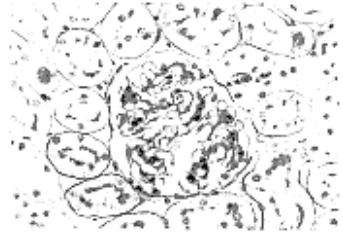


图 1 正常组大鼠肾小球结构正常 (PAS 染色 × 400)



图 2 高脂组大鼠肾小球系膜基质和基底膜明显增生 (PAS 染色 × 400)

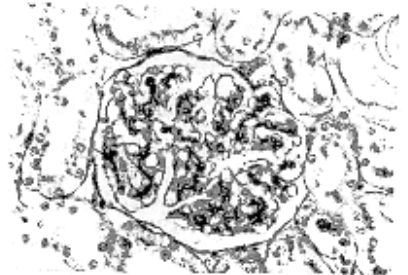


图 3 缬草组大鼠肾小球系膜基质和基底膜轻度增生 (PAS 染色 × 400)

2.2.2 TGF-β₁、IV 型胶原表达 TGF-β₁ 蛋白表达主要分布在肾小管上皮细胞胞质, 在正常大鼠中表达很少 (图 4), 高脂组大鼠肾小管中表达显著增加, 且在肾小球中也有较强表达 (图 5), 而缬草组大鼠肾小球和肾小管内 TGF-β₁ 表达均明显下降 (图 6)。正常大鼠肾小球系膜区和小管基底膜处有时可见 IV 型

胶原表达(图 7),在高脂组 IV 型胶原的表达明显增强,以系膜区多见(图 8),而缬草组大鼠肾组织内 IV

型胶原表达较高脂组显著减少(图 9)。3 组大鼠病理和免疫组化结果见表 3。

表 3 3 组大鼠病理学和免疫组化结果比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	M/G	TGF- β_1		IV 型胶原	
		肾小球	肾小管间质	肾小球	肾小管间质
高脂组	0.47 \pm 0.06 ²⁾	2.45 \pm 0.16 ²⁾	2.00 \pm 0.13 ²⁾	4.41 \pm 0.32 ²⁾	2.16 \pm 0.23 ²⁾
缬草组	0.34 \pm 0.05 ^{1 A)}	1.69 \pm 0.05 ^{2 A)}	1.08 \pm 0.21 ^{2 A)}	2.74 \pm 0.25 ^{2 A)}	0.99 \pm 0.28 ^{2 A)}
正常组	0.26 \pm 0.06	0.56 \pm 0.04	0.39 \pm 0.18	1.73 \pm 0.34	0.35 \pm 0.17

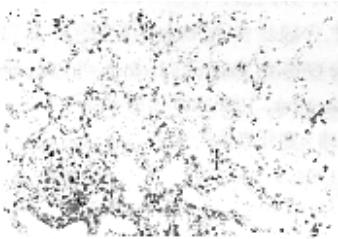


图 4 正常组大鼠肾组织 TGF- β_1 蛋白表达(SP 法 $\times 200$)

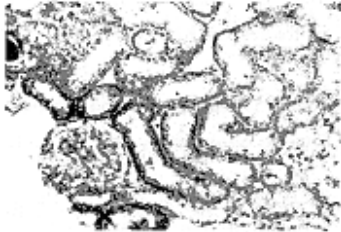


图 5 高脂组大鼠肾组织 TGF- β_1 蛋白表达(SP 法 $\times 200$)

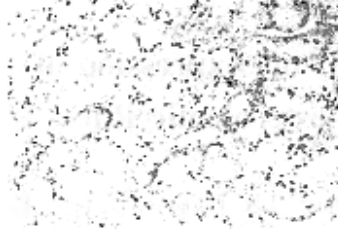


图 6 缬草组大鼠肾组织 TGF- β_1 蛋白表达(SP 法 $\times 200$)

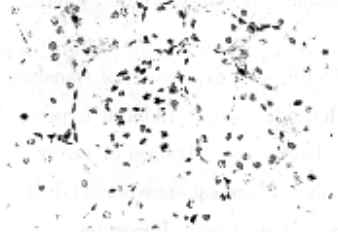


图 7 正常组大鼠肾组织 IV 型胶原表达(SP 法 $\times 400$)

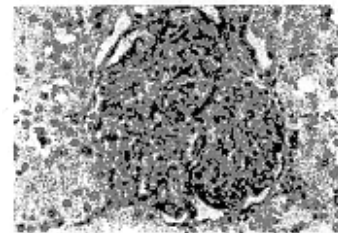


图 8 高脂组大鼠肾组织 IV 型胶原表达(SP 法 $\times 400$)

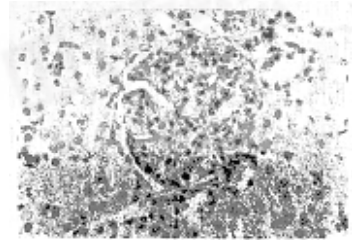


图 9 缬草组大鼠肾组织 IV 型胶原表达(SP 法 $\times 400$)

3 讨论

临床研究和动物实验均证实高脂血症可引起肾脏损害,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、系膜细胞增殖和细胞外基质积聚等,从而最终导致肾小球肥大和硬化。TGF- β_1 为一类多肽生长因子,机体大部分细胞均能合成。研究发现 TGF- β_1 具有多种生物活性^[4],它可通过自分泌和旁分泌方式刺激单核巨噬细胞、成纤维细胞和肾小管上皮细胞合成 IV 型胶原及蛋白聚糖;通过抑制胶原酶、丝氨酸蛋白激酶和纤溶酶原激活物(PA)的活性及增强纤溶酶原激活抑制物(PAI)和金属蛋白酶组织抑制物(TIMP)的活性,抑制细胞外基质蛋白降解,通过增加整合素及其它基质蛋白膜受体表达,促进靶细胞 ECM 表达;TGF- β_1 还能调节血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)等的作用,共同加速纤维化进程,从而被认为是导致肾硬化的关键性因素之一。Yoji N^[5]等给予培养的系膜细胞脂蛋白刺激 48 h 后即有 TGF- β_1 表达明显增加,且其表达随脂蛋白浓度增加而增高;Eddy A A^[6]在高胆固醇饮食大鼠喂养 4 周时也发现小管间质 TGF- β_1 蛋白表达显著上调。这些研究提示 TGF- β_1 参与了高脂血症所致肾损害发生发展的发病机制。在我们的研究中,大鼠接受高脂饮食 16 周后在血清总胆固醇及低密度脂蛋白增加同时,出现尿蛋白和肌酐明显增高,免疫组化提示 TGF- β_1 蛋白和 ECM 成分 IV 型胶原表达上调,

病理学检查发现系膜基质和基质指数明显增加,进一步证实高脂可导致肾损伤,而 TGF- β_1 在肾损伤的病程中起重要作用。

宽叶缬草为一种多年生野生草本植物,属败酱科缬草属,性平味辛,其根和根状茎可入药,具有镇静安神、解痉止痛的功效^[7],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^[3],但有关宽叶缬草在肾脏中的作用尚少见报道。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,在血脂下降同时,尿蛋白和血肌酐也较高脂组明显降低,证实宽叶缬草对高脂引起的肾损伤具有保护作用。进一步的病理学检查发现肾小球系膜基质和基质指数较高脂组大鼠显著减轻,细胞外基质成分 IV 型胶原表达下调,与此同时,肾组织内 TGF- β_1 表达减少。因此,我们认为,宽叶缬草肾保护作用的机制之一可能是在有效降脂的基础上,抑制了肾组织内 TGF- β_1 的表达,从而使细胞外基质产生减少,延缓了肾小球硬化的进程。本研究中宽叶缬草对 TGF- β_1 表达的下调并未达正常水平,可能表明宽叶缬草尚

通过其他机制同时参与对高脂诱导肾损伤的保护作用。

总之,脂质代谢异常可导致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] Wardle E N. Cytokine Growth Factors and Glomerulonephritis. *Nephron*, 1991, 57: 257.
- [2] Yamamoto T, Noble N A, Cohen A H, et al. Expression of Transforming Growth Factor- β Isoforms in Human Glomerular Disease. *Kidney Int*, 1996, 49: 461.
- [3] 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.
- [4] 孙铭柱,徐曼,邹万忠. 肾小管间质纤维化中转化生长因子 β_1 的表达特征. *中华肾脏病杂志*, 2000, 5: 291.
- [5] Yoji N, Hiroaki O, Noriaki Y. Effect of Lipoproteins on Mesangial Cell Proliferation. *Kidney Int*, 1999, 56 (suppl. 71): 51.
- [6] Eddy A A. Interstitial Inflammation and Fibrosis in Rats with Diet-induced Hypercholesterolemia. *Kidney Int*, 1996, 50: 1139.
- [7] 李时珍. 本草纲目. 第 14 卷. 北京: 人民卫生出版社, 1977: 854.

Effects of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* on Expression of Transforming Growth Factor β_1 in Hypercholesterolemic Rats.

SI Xiao-yun¹, JIA Ru-han², HUANG Cong-xin², DING Guo-hua², LIU Hong-yan²

(1. Department of Nephrology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;

2. Department of Nephrology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China)

[Abstract] **Objective**: To evaluate the effect of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* (VOL) on expression of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) in hypercholesterolemic rats and study its possible mechanisms. **Method**: Dietary-induced hypercholesterolemia was induced in male Wistar rats by given 4% cholesterol and 1% cholic acid diet for 16 weeks. Changes of serum lipid, urinary albumin, renal function and Mesangial matrix index were assessed. Moreover, immunohistochemical stain for TGF- β_1 and type IV collagen were performed. **Result**: VOL could reduce the serum levels of total cholesterol, low density lipoprotein, urinary albumin and serum creatinine. Light microscopy and immunohistochemical stain revealed that in the same time of lowering serum lipid, Mesangial matrix index was significantly reduced, accompanied by decreased expression of TGF- β_1 and type IV collagen. **Conclusion**: VOL has the protective effect on lipid-induced nephropathy, and the inhibition of TGF- β_1 expression might be the mechanism of VOL on renal protection.

[Key words] *Valeriana officinalis* var. *latifolia*; dietary-induced hypercholesterolemia; renal organization; transforming growth factor β_1

[责任编辑 方文贤]