

· 药物研究 ·

# 宽叶缬草对高脂血症大鼠肾小球 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响\*

司晓芸<sup>1</sup>, 贾汝汉<sup>1</sup>, 黄从新<sup>1</sup>, 丁国华<sup>1</sup>, 刘红燕<sup>1</sup>, 薛存宽<sup>2</sup>

(1. 武汉大学人民医院肾内科 430060 2. 湖北省老年病研究所, 武汉 430077)

[摘要] 目的 探讨宽叶缬草对高脂血症大鼠肾小球  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达的影响及其意义。方法 将 Wistar 大鼠 24 只随机分为高脂血症组(高脂组)、宽叶缬草组(缬草组)和正常组各 8 只,高脂组和缬草组饲喂由含 4%胆固醇和 1%胆酸钠组成的高脂饲料,正常组饲喂普通饲料,缬草组同时给予宽叶缬草提取物,缬草挥发油剂量 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃 16 周。观察大鼠血脂、尿蛋白、血肌酐和肾组织病理改变,并采用免疫组化技术检测肾小球  $\alpha$ -SMA 表达。结果:血清总胆固醇及低密度脂蛋白浓度高脂组大鼠显著高于缬草组和正常组( $P < 0.01$ ),缬草组高于正常组( $P < 0.01$ );高脂组尿蛋白和血肌酐较缬草组和正常组明显增高( $P < 0.01$ ),缬草组尿蛋白高于正常组( $P < 0.05$ );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,降低肾小球  $\alpha$ -SMA 表达。结论: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,并可以保护肾功能,机制可能与抑制肾小球系膜细胞表型转化有关。

[关键词] 宽叶缬草;高脂血症;肾小球; $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

[中图分类号] R282.71.05 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2003)04-0222-03

## Effect of Valeriana Officinalis Var Latifolia on the Expression of Glomerular $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Hyperlipidemic Rats

SI Xiao-yun<sup>1</sup>, JIA Ru-han<sup>1</sup>, HUANG Cong-xin<sup>1</sup>, DING Guo-hua<sup>1</sup>, LIU Hong-yan<sup>1</sup>, XUE Cun-kuan<sup>2</sup> (1. Department of Medical Nephrology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060 2. Institute of Geriatrics of Hubei Province, Wuhan 430071, China)

**ABSTRACT Objective:** To approach the effect of Valeriana officinalis var latifolia (VOL) on the expression of glomerular  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in hyperlipidemic rats and its possible significance. **Methods:** 24 Wistar rats were randomly divided into the hyperlipid group, VOL group and control group, with 8 rats in each group. Rats in the hyperlipid and VOL groups were fed with a chow containing 4% of cholesterol and 1% of sodium cholate, while those in the control group, with conventional chow. In addition, rats of the VOL group were given each VOL extract (containing VOL volatile oil in a dosage of 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) administered through gastric tubes for 16 consecutive weeks. Serum lipid, urinary protein excretion (UPE), serum creatinine (Scr), mesangial cell index and mesangial matrix index were kept under observation. Expression of glomerular  $\alpha$ -SMA was detected with the immunohistochemical technique. **Results:** VOL was found to decrease the serum levels of total cholesterol, low density lipoprotein, UPE and Scr. Light microscopy and immunohistochemical staining revealed that the mesangial cell index and mesangial matrix index were also significantly reduced in rats of the VOL group, accompanied with a decreased expression of glomerular  $\alpha$ -SMA. **Conclusion:** VOL was shown to have the effect of reducing serum lipid and protecting renal function, which might be attributed to the inhibition of glomerular mesangial cells undergoing phenotypic change.

**KEY WORDS** Valeriana officinalis var latifolia; Hyperlipidemia;  $\alpha$ -Smooth muscle actin, Glomerular

临床和动物实验均证实高脂血症和肾损害之间存在密切关系,高脂血症可导致肾小球硬化,加速肾功能衰竭的进程,但机制尚不很清楚,有研究表明肾固有细胞表型转化可能参与脂质肾损害的发病机制<sup>[1]</sup>。缬草为一类重要的中药资源,近年来研究发现缬草提取物不仅能调节血脂及抗脂质过氧化<sup>[2]</sup>,而且对慢性肾功

能衰竭的进程有延缓作用<sup>[3]</sup>。我们观察了宽叶缬草对肾小球系膜细胞表型转化标志蛋白—— $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达的影响,以进一步探讨宽叶缬草在脂质肾损害中的肾保护作用。

### 1 材料与方法

**1.1 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:由采自神农架林区的宽叶缬草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)。鼠抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA 抗体,福州迈新公司);链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组织

[收稿日期] 2001-12-17 [修回日期] 2002-01-07

[基金课题] \*湖北省自然科学基金资助项目(基金编号:99J142)

[作者简介] 司晓芸(1972-),女,湖北武汉人,博士,主要研究方向为慢性肾功能衰竭的防治。

化学(免疫组化)染色超敏试剂盒(SP Kit,福州迈新公司)。

**1.2 实验动物、高脂血症动物模型的制备** 雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重 170~220 g,平均 12 周龄,由湖北省老年病研究所动物中心提供。采用完全随机方法将大鼠分为三组:高脂血症组(高脂组)、宽叶缙草组(缙草组)和正常组,每组 8 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(蛋白质含量 25%),供高脂组和缙草组大鼠自由进食,正常组大鼠进食普通饲料。缙草组大鼠在进食高脂饲料同时,每日给予宽叶缙草提取物(缙草挥发油剂量 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)加 0.9% 氯化钠溶液至 2 mL 灌胃,高脂组和正常组大鼠每日给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。试验全过程 16 周。

**1.3 观察指标与方法**

**1.3.1 血脂、尿蛋白和血肌酐测定** ①血脂: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)用 Beckman 自动生化分析仪检测;②代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,用磺基水杨酸法检测尿蛋白(UPE)。③血肌酐(SCr)采用 Beckman 自动生化分析仪检测。

**1.3.2 组织病理学观察** 用 1% 戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔内注射麻醉大鼠,取下右肾,称重后置 10% 中性甲醛中固定,石蜡包埋,切片厚 3 μm,行 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);同时人工计数肾小球横切面细胞核数,其与肾小球面积(μm<sup>2</sup>)比作为肾小球细胞定量指数(MSC)。

**1.3.3 免疫组化检测(SP法)** 3 μm 切片常规脱蜡至水,按 SP Kit 说明书步骤行 α-SMA 染色,DAB 显色,脱水、透明、封片。以肾小球细胞胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性,每组染色均以 PBS 代替一抗作为阴性对照。采用 HPIAS-1000 高清晰度医学彩色病理图像分析系统对免疫组化结果行半定量分析,每份标本测 10 个肾小球,用积分光密度(ILD)表示阳性物质的相对含量。

**1.4 统计学处理** 运用 SPSS10.0 for Windows 统计软件分析处理数据,采用 one-way ANOVA 分析,以 P < 0.05 为差异有显著性。

**2 结果**

**2.1 血脂、尿蛋白和血肌酐变化** 高脂组大鼠血清 TC 及 LDL 浓度显著高于缙草组和正常组(P < 0.01),缙草组大鼠血清 TC 及 LDL 浓度较正常组升高。TG

和 LDL 三组间差异不显著(P > 0.05)。高脂组大鼠 UPE 和 SCr 较缙草组和正常组明显增高(P < 0.01),缙草组大鼠 UPE 高于正常组(P < 0.05)。结果见表 1。

表 1 三组大鼠血脂、尿蛋白和血肌酐检测结果  $\bar{x} \pm s$

检测指标 /mmol·L <sup>-1</sup>	高脂组	缙草组	正常组
TC	5.18 ± 1.06 <sup>*1</sup>	2.89 ± 0.39 <sup>*1,*2</sup>	1.01 ± 0.28
TG	0.89 ± 0.26	0.94 ± 0.25	0.67 ± 0.31
LDL	1.99 ± 0.57 <sup>*1</sup>	0.97 ± 0.09 <sup>*1,*2</sup>	0.32 ± 0.07
HDL	0.41 ± 0.06	0.46 ± 0.14	0.43 ± 0.13
UPE/mg·24 h <sup>-1</sup>	21.94 ± 3.00 <sup>*1</sup>	11.31 ± 2.34 <sup>*3,*2</sup>	6.85 ± 2.98
SCr/μmol·L <sup>-1</sup>	67.81 ± 12.83 <sup>*1</sup>	50.56 ± 10.61 <sup>*4</sup>	44.68 ± 8.08

注:与正常组比较,<sup>\*1</sup>P < 0.01,<sup>\*3</sup>P < 0.05;与高脂组比较,<sup>\*2</sup>P < 0.01,<sup>\*4</sup>P < 0.05

**2.2 组织病理学观察** 正常组大鼠肾小球结构清楚,细胞数和系膜基质无增多,高脂组大鼠多数肾小球细胞数增生明显,系膜基质呈中、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,缙草组大鼠肾小球系膜细胞增生和基质增多较高脂组大鼠明显减轻,部分肾小球基底膜可见轻度增厚,肾小球系膜基质指数和细胞定量指数也明显低于高脂组(见表 2)。

**2.3 免疫组化** 正常大鼠肾小球内偶见散在 α-SMA 表达,高脂组大鼠肾小球内 α-SMA 蛋白表达明显,阳性物质主要位于肾小球系膜区和球囊粘连处,缙草组大鼠肾小球内 α-SMA 表达较高脂鼠显著下降。三组大鼠肾小球病理和免疫组化结果见表 2。

表 2 三组大鼠肾小球病理和免疫组化结果  $\bar{x} \pm s$

检测指标	高脂组	缙草组	正常组
M/G	0.47 ± 0.06 <sup>*1</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>*2,*3</sup>	0.26 ± 0.06
MSC/%	0.44 ± 0.14 <sup>*1</sup>	0.30 ± 0.10 <sup>*2,*4</sup>	0.16 ± 0.09
α-SMA	3.62 ± 0.22 <sup>*1</sup>	1.90 ± 0.09 <sup>*1,*3</sup>	0.71 ± 0.11

注:与正常组比较,<sup>\*1</sup>P < 0.01,<sup>\*2</sup>P < 0.05;与高脂组比较,<sup>\*3</sup>P < 0.01,<sup>\*4</sup>P < 0.05

**3 讨论**

肾小球系膜细胞是肾小球疾病时致病因子作用的主要靶细胞之一,其增殖及分泌大量细胞外基质在肾小球硬化过程中起重要作用。α-SMA 是系膜细胞表型转化的良好标志<sup>[4]</sup>,其表达增高提示系膜细胞由静止表型被激活,转化为增殖表型和(或)分泌表型,从而使系膜细胞具有了肌纤维细胞样特性并能够分泌 I、III 型胶原等细胞外基质成分。正常大鼠肾脏中除肌性血管外,其他组织构成分中见不到或仅可见极为微弱的 α-SMA 表达,而在肾小球疾病过程中,系膜细胞可大量增殖并伴 α-SMA 表达增多,呈现活化表型,并通过自

分泌和旁分泌方式参与疾病的进一步发展<sup>[5]</sup>。Guijaro 等<sup>[6]</sup>发现,接受含 4%胆固醇和 2%胆酸钠的高脂饲料喂养的大鼠仅 4 周即可出现肾小球肥大和系膜细胞增生。Yoji 等<sup>[7]</sup>用不同浓度的脂蛋白直接刺激培养的系膜细胞,发现随脂蛋白浓度增加,系膜细胞增殖和分泌 TGF-β<sub>1</sub> 等细胞因子也随之增加。这些研究证实系膜细胞也参与脂质肾损害发生发展的发病机制。

宽叶缬草为一种多年生野生草本植物,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<sup>[8]</sup>。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<sup>[2]</sup>,我科的前期研究也发现缬草挥发油能抑制肾内转化生长因子 β<sub>1</sub> 表达,延缓慢性肾衰竭的进程<sup>[3]</sup>。受其启示,我们应用宽叶缬草治疗高脂血症大鼠,以进一步探讨宽叶缬草肾保护作用的可能机制。本实验结果显示,大鼠接受高脂饮食 16 周后出现血脂上升和肾功能异常,肾小球出现明显的病理改变,与此同时,肾小球内 α-SMA 蛋白表达明显上升。提示病理状态下高脂可能导致系膜细胞发生表型转化而激活,激活的细胞发生增殖并产生大量细胞外基质成分,诱导肾损伤发生。但对于接受宽叶缬草治疗的大鼠,其血脂较高脂组明显下降,尿蛋白和血肌酐也有显著减少,α-SMA 的表达较高脂组大鼠有显著下降,并伴有系膜基质和系膜细胞增生的下降。表明宽叶缬草能够降低血脂和保护肾功能。其肾保护机制可

能在于抑制了肾小球系膜细胞向肌纤维样细胞的表型转化,减少了细胞外基质的产生,从而延缓了肾小球病变恶化的进程。但宽叶缬草通过何种环节抑制肾小球系膜细胞的表型转化,尚有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Jaap A J, Uta K, Ulf J, et al. Early mechanism of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(10): 669-683.

[2] 杨桂元,王 玮.宽叶缬草治疗冠心病的临床研究[J].中国中西医结合杂志,1994,9(9):540-542.

[3] 贾汝汉,石 明,丁国华,等.缬草油对大鼠慢性肾功能衰竭模型的防治[J].中华肾脏病杂志,2001,5(5):264-265.

[4] Johnson R J, Lida H, Alpers C E, et al. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis[J]. *J Clin Invest*, 1991, 87(12): 847-850.

[5] 王 玉,李晓玫.α-肌动蛋白在肾系膜细胞重塑过程中的变化及其意义[J].国外医学泌尿系统分册,1997,17(4):172-175.

[6] Guijaro C, Kasiske B L, Kim Y, et al. Early glomerular changes in rats with dietary-induced hypercholesterolemia[J]. *Am J Kid Dis*, 1995, 26(3):152-161.

[7] Yoji N, Hiroaki O, Noriaki Y. Effect of lipoproteins on mesangial cell proliferation[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(Suppl 71):51-53.

[8] 张振学,姚新生.药用植物缬草的化学研究进展[J].中国药物化学杂志,2000,10(3):226-230.

## 吗啡依赖大鼠血清尿酸及 ALT、AST 的检测分析

刘剑凯<sup>1</sup>,洪 敏<sup>1</sup>,赵小冬<sup>2</sup>,李 莉<sup>1</sup>

(1. 吉林大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,长春 130021; 2. 吉林大学中日联谊医院,长春 130031)

[摘要] 目的 检测吗啡依赖大鼠血清肝功能生化指标及核苷酸代谢参数的变化。方法 Wistar 大鼠 35 只,随机分成 5 组,每组 7 只。第 1 组为对照组,给予 0.9%氯化钠注射液;第 2 组给予盐酸吗啡 20~95 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,分 2 次 ip,共 7 d;第 3 组在给予盐酸吗啡的同时,给予嘌呤碱基混悬液 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig;第 8 天给予盐酸纳洛酮 4 mg·kg<sup>-1</sup> ip,观察戒断体征;第 4 组用嘌呤核苷混悬液替代嘌呤碱基混悬液,其余同第 3 组;第 5 组给予盐酸吗啡和盐酸纳洛酮,用量和用法同第 3 组。采用 Beckman 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)及尿酸检测试剂盒测定相应指标。结果:发现了吗啡依赖大鼠血清尿酸水平升高,ALT 及 AST 酶活性升高。结论:吗啡可引起组织细胞嘌呤核苷酸分解代谢增强,引起肝脏功能的损伤。

[关键词] 吗啡依赖,尿酸,丙氨酸氨基转移酶,天冬氨酸氨基转移酶

[中图分类号] R971.2;R446.11 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2003)04-0224-03

### Determination of Uric Acid and ALT /AST in the Serum of Morphine Dependent Rats

LIU Jian-kai<sup>1</sup>, HONG Min<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-dong<sup>2</sup>, LI Li<sup>1</sup>(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Basic Medical School of Jilin University, Changchun 130021; 2. The Sino-Japanese Fellowship Hospital, Changchun 130031, China)