

淫羊藿苷对自发性高血压大鼠肾损伤的改善作用及机制研究^Δ

朱玲^{1*}, 钱志强¹, 李叶丽¹, 王俊逸¹, 杨华², 杨丹莉^{1#} (1. 遵义医学院药理学教研室/基础药理省部共建教育部重点实验室, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医学院附属医院病理科, 贵州遵义 563000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1326-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.08

摘要 目的: 观察淫羊藿苷(ICA)对自发性高血压大鼠(SHR)肾组织病理损伤的影响, 并基于核因子κB(NF-κB)信号通路研究其作用机制。方法: 将21只SHR随机均分为模型组和ICA低、高剂量组(20、40 mg/kg, 记为ICA-L、ICA-H组), 另取7只同源京都大鼠(WKY)为对照组。各组大鼠ig给药, 每日2次, 连用11周; 对照组和模型组大鼠ig等体积双蒸水。观察各组大鼠肾组织病理学变化; 蛋白质印迹法检测肾组织磷酸化NF-κB-p65(p-NF-κB-p65)、NF-κB抑制蛋白(IκB)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)蛋白的表达。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠肾结构出现紊乱, 肾小球囊腔狭窄且不规则; IκB蛋白的表达明显下调, p-NF-κB-p65、TNF-α蛋白的表达均明显上调($P < 0.01$)。与模型组比较, ICA-L、ICA-H组大鼠肾组织上述病理变化有所改善; ICA-L、ICA-H组IκB蛋白的表达均明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), ICA-H组大鼠p-NF-κB-p65、TNF-α蛋白的表达均明显下调($P < 0.01$), ICA-L组大鼠p-NF-κB-p65蛋白表达明显下调($P < 0.05$), 而ICA-L组大鼠TNF-α蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: ICA具有改善SHR肾病理损伤的作用, 其机制可能与抑制NF-κB信号通路相关。

关键词 淫羊藿苷; 自发性高血压大鼠; 肾组织; 磷酸化核因子κB-p65; 肿瘤坏死因子α

Study on Improvement Effect and Mechanism of Icariin on Renal Lesion in Rats with Spontaneous Hypertension

ZHU Ling¹, QIAN Zhiqiang¹, LI Yeli¹, WANG Junyi¹, YANG Hua², YANG Danli¹ (1. Teaching and Research Office of Pharmacology/the Key Laboratory for Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China; 2. Dept. of Pathology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To observe the effect of pathological lesion of renal tissue in rats with spontaneous hypertension (SHR), and study its mechanisms based on nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway. **METHODS:** 21 SHR were randomly divided into model group and ICA low-dose, high-dose groups (20, 40 mg/kg, denoted by ICA-L, ICA-H groups); other 7 homologous Kyoto rats (WKY) were regarded as control group. All rats were intragastrically administrated, twice a day, for 11 weeks, rats in control group and model group received equal volume of double distilled water, ig. Pathological changes in renal tissue in each group were observed; Western blot method was used to detect protein expressions of p-NF-κB-p65, IκB and TNF-α in renal tissue. **RESULTS:** Compared with control group, model group showed disorder renal structure, narrow and irregular glomerular cysts; the protein expression of IκB was significantly down-regulated, protein expressions of p-NF-κB-p65 and TNF-α were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, the above-mentioned changes of rats showed improvement in ICA-L, ICA-H groups; the protein expression of IκB was significantly up-regulated in ICA-L, ICA-H groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the protein expressions of p-NF-κB-p65 and TNF-α were significantly down-regulated ($P < 0.01$) in ICA-H groups; p-NF-κB-p65 protein expression was significantly down-regulated in ICA-L group ($P < 0.05$); while there was no significant difference in TNF-α protein expression in ICA-L group ($P > 0.05$). **CONCLUSIONS:** ICA plays a role in improving renal pathological lesion in SHR, and the mechanism may be related to inhibiting NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS Icariin; Spontaneously hypertension rats; Renal tissue; p-NF-κB-p65; TNF-α

近年来, 高血压肾病患者的数量呈逐年上升趋势^[1], 其为高血压的主要并发症之一^[2]。自发性高血压大鼠

(SHR)是目前公认的研究原发性高血压及其并发症的动物模型。淫羊藿系小檗科淫羊藿属植物, 为我国传统补益中药, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。淫羊藿苷(ICA)是淫羊藿的主要活性成分之一, 具有降压、改善缺血再灌注损伤、增强免疫力等作用^[3-4]。本课题组前期研究发现, ICA可降低SHR血压, 改善其左心室重构、减轻肾纤维化、对抗肾小管上皮细胞凋亡^[5-7]。据文献报道, 核因子κB(NF-κB)信号通路在高血压肾损伤的发

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.812411142, 81660679)

* 硕士研究生。研究方向: 心血管药理学、抗炎免疫药理学。电话: 0851-28643568。E-mail: lingluhappy@foxmail.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 心血管药理学、抗炎免疫药理学。电话: 0851-28643568。E-mail: zmuyangdanli@foxmail.com

生、发展中起着枢纽作用^[8]。因此,在本研究中笔者拟探讨ICA对SHR肾实质损伤的改善作用,并探讨这一作用是否与其抑制NF- κ B信号通路的机制有关,以期为ICA的进一步应用提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

Mastercycler Gradient 梯度聚合酶链式反应仪(德国Eppendorf公司); Supply Mini-Protean3 电泳仪、Trans Blor TurboMini Trans-Blot 转移系统、Universal Hood 11 CCD 成像系统(美国Bio-Rad公司); BX43+DP2b Olympus 光学显微镜及照相系统(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

ICA 原料药(南京泽朗医药有限公司,批号: FY17420615,纯度: $\geq 98\%$); 磷酸化NF- κ B-p65(p-NF- κ B-p65)、NF- κ B抑制蛋白(I κ B)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 兔源多抗(美国Abcam公司); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(上海康成生物技术有限公司); 免疫印迹化学发光试剂(ECL,上海七海生物有限公司); HRP 标记的山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)(H+L)二抗(江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.3 实验动物

SHR 21只, δ , 14周龄; 同源京都大鼠(WKY)7只, δ , 体质量均为260~300 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号: SCXK(京)2012-0001]。

2 方法

2.1 分组与给药

21只SHR随机均分为模型组和ICA低、高剂量组(20、40 mg/kg, 记为ICA-L、ICA-H组), 给药剂量根据前期预实验确定^[9], 低剂量相当于人临床等效剂量的6.3倍^[9]; 另取7只WKY作为对照组。所有大鼠适应性饲养1周后ig给药, 每日2次, 连用11周; 对照组和模型组大鼠ig等体积双蒸水。

2.2 各组大鼠肾组织病理观察

实验结束后, 各组大鼠ip7%水合氯醛(0.53 g/kg)麻醉后处死, 取肾组织置于4%甲醛溶液中固定48 h后, 行苏木精-伊红(HE)染色, 光镜下观察肾组织病理变化。

2.3 各组大鼠p-NF- κ B-p65、I κ B、TNF- α 蛋白表达

采用蛋白质印迹(Western blot)法测定。称取“2.2”项下大鼠肾组织约0.1 g, 剪碎后置于1 mL RIPA裂解液中, 加入苯甲基磺酰氟10 μ L, 冰上匀浆后静置30 min, 4 $^{\circ}$ C离心(离心半径为9 cm, 12 000 r/min)20 min。取上清液, 用聚氰基丙烯酸正丁酯法测定待测样品的总蛋白浓度。每孔上样量为30 μ g, 蛋白配置为10 μ L上样体系。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶, 上层为5%浓缩胶, 下层为12%分离胶。电泳后采用Bio-Rad Mini Trans-Blot 转移系统聚偏氟乙烯(PVDF)膜转膜, 5%蛋

白封闭液封闭2.5 h, TBST洗膜10 min \times 3次, 一抗结合: GAPDH(1:5 000)、p-NF- κ B-p65(1:500)、I κ B(1:2 000)、TNF- α (1:2 000), 4 $^{\circ}$ C过夜; TBST洗膜, HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗(1:2 000), 常温孵育1.5 h, ECL化学发光显色, 采用Bio-Rad CCD成像系统获取图像。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件对所得数据进行分析。采用ONE-WAY ANOVA检验, 方差齐时采用LSD法, 方差不齐时采用Dunnett T3法。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肾组织病理观察结果

光镜观察结果显示, 对照组大鼠肾小球、肾小管结构正常; 与对照组比较, 模型组大鼠肾小球囊腔狭窄且不规则, 肾小球系膜基质增多, 毛细血管扩张充血, 细胞排列紊乱, 肾小管上皮细胞水肿、管腔狭窄; 与模型组比较, ICA-L、ICA-H组大鼠肾小球囊腔增宽, 部分毛细血管扩张充血, 细胞排列紊乱有所改善, 毛细血管管腔开放良好, 肾小管上皮细胞水肿减轻, 详见图1。

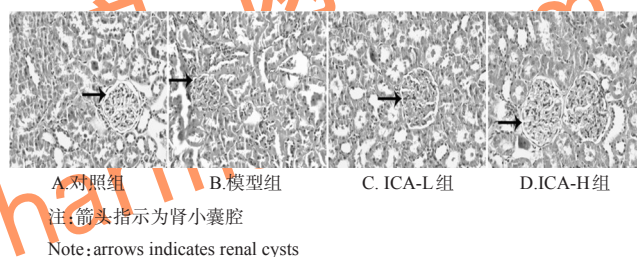


图1 各组大鼠肾组织病理观察结果($\times 400$)

Fig 1 Pathological observation results of kidney tissue of rats in each group($\times 400$)

3.2 各组大鼠p-NF- κ B-p65、I κ B、TNF- α 表达结果

与对照组比较, 模型组大鼠I κ B蛋白的表达明显下调(P<0.01), p-NF- κ B-p65、TNF- α 蛋白的表达均明显上调(P<0.01); 与模型组比较, ICA-L、ICA-H组大鼠I κ B蛋白的表达明显上调(P<0.05或P<0.01), ICA-H组p-NF- κ B-p65、TNF- α 蛋白的表达均明显下调(P<0.01), ICA-L组p-NF- κ B-p65蛋白表达明显下调(P<0.05), 而ICA-L组TNF- α 蛋白表达差异无统计学意义(P>0.05), 详见图2、表1。

4 讨论

高血压是心脑血管疾病、肾疾病等的重要危险因素。高血压肾病通常是指原发性高血压导致的肾小动脉或肾实质损害, 又称为高血压肾硬化症。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾小球囊腔狭窄且不规则, 肾小球系膜基质增多, 毛细血管扩张充血, 细胞排列紊乱, 肾小管上皮细胞水肿、管腔狭窄, 说明SHR出现了高血压肾实质损害的病理改变。然而, 给予ICA-L、ICA-H后, SHR紊乱的肾结构有所减轻, 这与之前报道

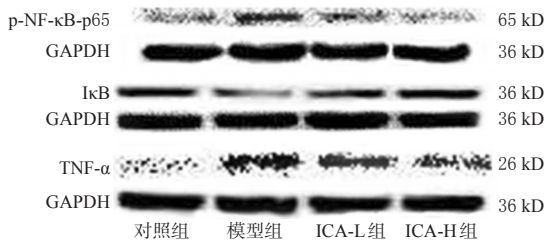


图2 各组大鼠 p-NF-κB-p65、IκB、TNF-α 蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoresis chart of protein expressions of p-NF-κB-p65, IκB, TNF-α of rats in each group

表1 各组大鼠 p-NF-κB-p65、IκB、TNF-α 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Protein expression levels of p-NF-κB-p65, IκB, TNF-α of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	p-NF-κB-p65	IκB	TNF-α
对照组	0.82 ± 0.17	1.35 ± 0.22	0.49 ± 0.10
模型组	1.26 ± 0.06**	0.64 ± 0.18**	1.17 ± 0.10**
ICA-L组	1.12 ± 0.06#	0.95 ± 0.07#	1.11 ± 0.12
ICA-H组	0.94 ± 0.10##	1.21 ± 0.08##	0.82 ± 0.07##

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

Note: vs. control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

ICA具有改善SHR肾病理学性损害的结论^[9]相一致。

静息状态下,NF-κB以p65/p50异源二聚体的形式与其抑制蛋白IκB结合存在于细胞质中,无活性。当细胞受到病毒、机械力、氧化应激、炎症因子等刺激时,IκB在IκB激酶的作用下发生磷酸化并降解,NF-κB被激活,磷酸化的p65/p50迅速从胞浆转移至胞核,尤其是p65亚型,与DNA链上的κB位点结合,启动级联反应,诱导TNF-α、白细胞介素1β等转录。在高血压状态下,NF-κB激活可造成肾损害^[10]。在本研究中,与对照组比较,模型组大鼠肾组织IκB蛋白的表达明显下调,p-NF-κB-p65水平明显升高。然而,给予ICA后,SHR的IκB蛋白表达明显上调,p-NF-κB-p65的水平明显降低。这提示ICA可能通过抑制NF-κB的激活和IκB降解,从而减轻SHR肾病理学性损伤。

TNF-α是NF-κB的下游因子之一^[11],参与了高血压肾损害的发生和发展^[12-13],也是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎症因子,能激活中性粒细胞和淋巴细胞,使血管内皮细胞通透性增加,调节其他组织代谢活性并促使其他细胞因子的合成和释放。Elmarakby AA等^[14]研究发现,TNF-α阻滞药可减轻盐敏感高血压大鼠的慢性肾损伤。在本研究中,与对照组比较,模型组大鼠肾组织的TNF-α蛋白表达明显上调,而ICA可明显下调TNF-α蛋白表达。这提示ICA可能通过抑制NF-κB信号,下调TNF-α蛋白表达,从而减轻SHR肾病理学性损伤。

综上所述,ICA具有改善SHR肾病理学性损伤的作

用,其机制可能与其抑制NF-κB信号通路相关。

参考文献

- [1] 郑健军,余贤广.氯沙坦对原发性高血压患者血管内皮功能及肾功能的保护作用[J].中国药房,2012,23(12):1106-1107.
- [2] Sciarretta S, Valenti V, Tocci G, et al. Association of renal damage with cardiovascular diseases is independent of individual cardiovascular risk profile in hypertension: data from the Italy-developing education and awareness on microalbuminuria in patients with hypertensive disease study[J]. *J Hypertens*, 2010, 28(2): 251-258.
- [3] 龚其海,杨丹莉,石京山,等.淫羊藿苷的神经药理作用及分子机制研究进展[J].中国新药与临床杂志,2011,30(7):481-486.
- [4] 李婵,王学美.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(23):2727-2732.
- [5] 王颖婉,李叶丽,李意奇,等.淫羊藿苷通过降低MMP-9抗自发性高血压大鼠心室重构[J].遵义医学院学报,2014,37(2):170-177.
- [6] 李叶丽,王颖婉,李意奇,等.淫羊藿苷通过降低醛固酮水平减轻自发性高血压大鼠肾间质纤维化[J].中国药理学通报,2014,30(4):519-522.
- [7] 朱玲,王颖婉,李叶丽,等.淫羊藿苷抗自发性高血压大鼠肾小管上皮细胞凋亡的作用[J].中国药理学通报,2016,32(4):537-541.
- [8] Kim KI, Lee JH, Chang HJ, et al. Association between blood pressure variability and inflammatory marker in hypertensive patients[J]. *CIRC J*, 2008, 72(2): 293-298.
- [9] 施新猷.现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社,2000:334-335.
- [10] 常晓铁,刘龙民.核因子κB及炎症反应在原发性高血压肾损害中的作用[J].广东医学,2010,31(11):1493-1494.
- [11] LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer[J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3247-3259.
- [12] 于欣,张保和,于美玲,等. TNF-α、IL-6与高血压肾损害的相关性及其受贝那普利的影响[J].中国实验诊断学,2011,15(3):492-495.
- [13] 杨震,郭维娜,于欣,等.肾动脉阻力指数、TNF-α和IL-10在高血压肾损害患者中的变化及其相关性研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(13):1666-1670.
- [14] Elmarakby AA, Quigley JE, Pollock DM, et al. Tumor necrosis factor alpha blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension[J]. *Hypertension*, 2006, 47(3): 557-562.

(收稿日期:2016-06-06 修回日期:2017-02-07)

(编辑:刘明伟)