

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0611-03

• 实验研究 •

黄芩苷通过降低高脂血症大鼠肾小球核因子 KB 及可溶性单核细胞趋化蛋白表达抑制肾脏炎症反应

李 绚^{1,2}, 阎蓉华¹, 彭 谨²

(四川大学华西医学中心基础医学与法医学院 1 病理生理教研室 感染免疫研究室,

2 组胚教研室, 四川省成都市 610041)

[关键词] 肾小球; 黄芩苷; 核因子 KB; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] 目的 观察黄芩苷对高脂血症实验性大鼠肾小球核因子 KB 及外周血单核细胞趋化蛋白 1 表达的干预作用。方法 实验组动物采用高脂混合饲料+维生素 D₃ 喂养方式, 建立高脂血症大鼠模型, 黄芩苷组在制备模型同时选用 20 mg/(kg·d) 的黄芩苷水溶液灌胃, 对照组喂以标准饲料。4 周末测定血脂, 取肾小球组织比较病理形态学变化, 采用双抗体夹心 ELISA 法定量分析血清单核细胞趋化蛋白 1 水平, SABC 免疫组织化学法检测肾小球核因子 KB 表达。结果 黄芩苷组大鼠血清中总胆固醇、低密度脂蛋白量减少, 单核细胞趋化蛋白 1 分泌降低, 与模型组相比黄芩苷组肾小球病理改变有所减轻, 核因子 KB 表达下调明显, 两者间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 黄芩苷具有降低低密度脂蛋白含量, 降低核因子 KB 在肾小球细胞内激活, 下调单核细胞趋化蛋白 1 表达水平, 调节血脂紊乱及抗炎的作用。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Baicalin Suppressed Inflammatory Reaction by Decreasing Nuclear Factor- κ B and Soluble Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Hyperlipidemia Rat

LI Xuan¹, YAN Ronghua¹, and PENG Jing²

(1 Department of Pathophysiology and Leptospirosis 2 Department of Histology and Embryology, West China Medical Centre of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[KEY WORDS] Baicalin; Glomerulus; Nuclear Factor- κ B; Monocyte Chemoattractant Protein-1

[ABSTRACT] **Aim** To access the effect and mechanisms of baicalin on expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in experimental atherosclerotic rat. **Methods** High fat forage and vitamin D₃ was given by intragastric administration, the experimental group was given baicalin solution 20 mg/(kg·d) for four weeks. The blood lipid, plasma MCP-1 and immunohistochemistry detection of NF- κ B on the renal glomerulus was performed. **Results** The total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) in the serum of rats decreased in the experimental group to 30% baseline values treated by baicalin. The hyperlipidemia markedly raised the activities and contents of MCP-1 in plasma after modeling. Renal interstitium was hyperemic, the glomerular volume became extension, and NF- κ B was markedly expressed in the podocyte and tubular epithelial cells than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Baicalin has the function of reducing the levels of LDL, reducing the NF- κ B activating in glomerular cells, reducing the performance of MCP-1, and adjusting blood fat disorders and antiinflammatory.

最新研究表明脂质异常介导的炎症是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 和肾脏病理损害的中心环节^[1]。低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白作为前炎症介质, 以剂量依赖性方式与肾小球细胞结合, 并刺激单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 高效表达

从而趋化单核巨噬细胞参与肾小球损伤。在此过程中核因子 KB (NF- κ B) 活化发挥着重要的信号传导作用, 是启动和转录合成 MCP-1 靶分子表达的主要调控基因。现代生物医学研究表明, 黄芩苷具有抗炎及调节血脂紊乱等多项功能。本实验通过现代生物免疫技术, 从基因转录水平上探讨高脂血症与肾小球组织 NF- κ B 表达、可溶性 MCP-1 的关系及黄芩苷的作用。

[收稿日期] 2010-07-25

[修回日期] 2010-08-16

[基金项目] 国家中医药管理局科学技术研究课题 (04-05ZP54); 四川省科技厅项目 (03JY029-073-1)

[作者简介] 李绚, 副教授, 研究方向为炎症、心血管系统疾病防治及中医药现代研究, E-mail 为 lixuan@scu.edu.cn。阎蓉华, 高级实验师, 研究方向为心血管系统疾病防治及中医药的现代研究, E-mail 为 yanronghua@scu.edu.cn。彭谨, 讲师, 研究方向为组织学和神经生物学, E-mail 为 pengjing@scu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要材料

SD 大鼠由四川大学华西医学中心实验动物中

心提供。黄芩苷 (四川广汉市维康植化有限公司, 含量 90.8%)。鼠 NF- κ Bp65 氨基端单克隆 IgG1 抗体 (Santa cruz USA), 生物素化羊抗小鼠 IgG1 抗体; SABC 系统 (博士德), MCP-1 ELISA 试剂盒 (DR Lab USA), 其余常规试剂均为进口及国产分析纯。全自动生物化学分析仪 (日本), Axiovert 1350 倒置相差显微镜成像系统 (德国 ZEISS 公司), Model 1550 型全自动酶标仪 (美国 BIORAD 公司)。

1.2 动物分组及模型制备

取 7~8 周龄、体重 200~250 g 雄性 SD 大鼠 24 只, 适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组和黄芩苷组, 每组 8 只。模型组和黄芩苷组均在饲以高脂饲料前按 70 万 U/kg 总剂量分 3 天以灌胃方式给予 VD₃, 随后用高胆固醇和脂类饲料 (在标准全价颗粒饲料配方基础上加 1% 胆固醇、0.35% 胆酸、10% 猪油和 0.61% 丙基硫氧嘧啶) 喂养大鼠; 黄芩苷组大鼠在饲以高脂饲料的同时按每天 20 mg/kg 的剂量灌胃黄芩苷, 连续 4 周。灌药前禁食 4 h, 自由取水; 对照组在饲以标准饲料的同时予以灌胃同等量生理盐水。该试验重复三次。

1.3 血液生物化学指标检测

实验结束后, 在麻醉和常规无菌条件下分别采集各组 SD 大鼠心血 4℃ 过夜, 待血清析出后, 2500 r/min 离心 10 min 收集血清, 采用日本全自动生物化学分析仪, 血生物化学测定盒检测生物化学指标。

1.4 单核细胞趋化蛋白检测

严格按照 MCP-1 Sandwich ELISA 说明书标准方法, 取已包被 Streptavidin 的 96 孔板条, 分条每孔依次加入 10 μ L 梯度为 0、45、90、225、450、900 ng/L 标准品 (Standards) 及待测血清 (每组设三个平行孔), 孵育 2 h 后加 50 μ L 抗 MCP-1 生物素和 50 μ L 抗 MCP-1 POD 轻轻混匀 30 s, 封板置室温作用 45 min 弃上清, 洗涤液洗板 5 次, TBM 显色, 终止, 于酶标仪上读取 450 nm 的 OD 值, 以 OD 值为纵坐标, 分别以标准品及血清样品为横坐标, 绘制标准及血清样品曲线图。根据血清样品与标准曲线 OD 值所标出相等点 (临界), 计算 MCP-1 浓度。

1.5 标本取材

分别取各组禁食 12 h 的 SD 大鼠, 在麻醉条件下迅速剖腹, 摘取两侧肾脏, 去除肾包膜及肾门周边的结缔和脂肪组织, 用 4℃ 生理盐水反复冲洗后, 将修整的样本, 置预冷 4% 多聚甲醛液 (PBS pH 7.4) 中室温固定 24 h, 酒精梯度脱水, 常规石蜡包埋, 在制成片厚为 5 μ m 多聚赖氨酸处理切片后, 行免疫酶染色。

1.6 核因子 κ Bp65 免疫组织化学染色

采用 SABC 法, 切片常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 微波抗原修复, 1:10 正常山羊血清室温封闭非特异抗原后; 依次加入 1:200 小鼠 NF- κ B p65 氨基端单克隆 IgG1 抗体 4℃ 过夜, 1:200 生物化羊抗小鼠 IgG1 抗体 37℃ 30 min, 1:200 SABC 20 min, 各步骤间 PBS 洗涤分别为 3~4 次, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。采用高清晰度彩色病理图文报告分析系统捕捉图片区域, 对肾小球 NF- κ B 的表达进行分析。

1.7 统计学处理

使用 PEMS3.1 软件包做统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷对血脂的影响

与对照组相比, 模型组大鼠血清总胆固醇 (TC) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 含量明显升高 ($P < 0.01$), 而黄芩苷溶液则可显著下调血清中 TC、LDLC 含量, 下降百分率分别为 44.54%、47.99% ($P < 0.01$; 表 1)。

2.2 黄芩苷对单核细胞趋化蛋白 1 分泌的影响

对照组有少量 MCP-1 分泌, 模型组血清中可溶性 MCP-1 分泌量明显增高, 而同时灌服黄芩苷溶液则可降低 MCP-1 分泌量 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1 各组大鼠血脂水平和 MCP-1 分泌量比较

分 组	n	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	MCP-1 (ng/L)
对照组	6	1.74 \pm 0.29	0.49 \pm 0.26	67.50 \pm 3.15
模型组	6	6.03 \pm 0.60 ^a	4.50 \pm 0.45 ^a	103.95 \pm 8.79 ^a
黄芩苷组	6	3.34 \pm 0.60 ^b	2.34 \pm 0.51 ^b	71.55 \pm 3.52 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.3 肾小球病理形态学变化

光镜下对照组大鼠肾组织均未见明显病理性损害, 模型组可见肾小球明显肿胀, 系膜区增宽, 肾小球基膜增厚, 细胞结节形成, 黄芩苷组较模型组有所减轻。

2.4 黄芩苷对核因子 κ B p65 活性的影响

对照组大鼠肾小囊脏层及肾小球血管壁部位可见数量不等分布不均的 NF- κ Bp65 阳性表达颗粒, 且多见于胞浆; 而模型组给予高脂饲料后肾小球足细胞 NF- κ Bp65 阳性表达量显著增高, 表现为深棕黄色密集度大的颗粒, 多分布于血管密集区域, 尤以

细胞核明显;黄芩苷组深棕黄色颗粒比模型组明显减少(图 1)。利用 Image pro plus 分别监测各组深棕黄色部分光密度积分值占整个图像光密度积分值百分比,可见 NF- κ B p65 表达阳性细胞光密度积分值在模型组明显升高且数据变异程度增大,使用黄芩苷之后数值有所下降。与模型组相比,黄芩苷组肾小球 NF- κ B p65 表达明显下调 ($P < 0.01$)。箱式图分析表明,模型组肾小球 NF- κ B p65 阳性颗粒在照片中光密度积分值明显升高,而利用黄芩苷灌胃之后,光密度积分值出现明显下降(图 2)。

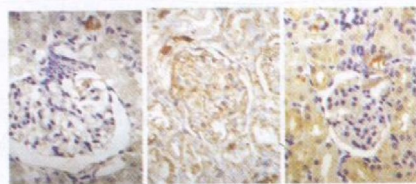


图 1. 免疫组织化学染色检测核因子 κ B p65 表达 从左到右依次为对照组(×100)、模型组(×200)和黄芩苷组(×100)。

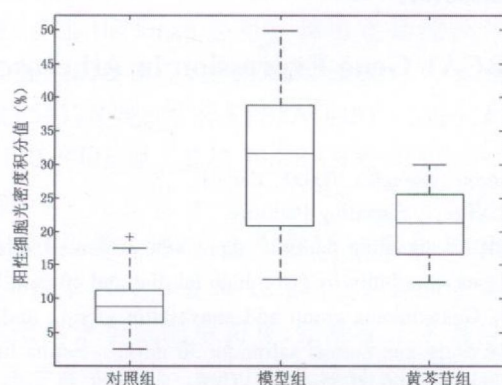


图 2. 核因子 κ B p65 表达阳性细胞光密度积分值 箱式图中间横线表示光密度百分比均值,上下端分别表示 75% 及 25% 的分位数,顶须线表示积分光密度分布最大值最小值。

3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 的各种改变是炎症的不同阶段,各种细胞反应本质上与炎症过程相似,属于机体对损伤的一种反应^[2]。近年来有证据显示,肾小球硬化 (GS) 与 As 在病理改变上具有相同的炎症反应激活特征,并提出“肾小球动脉粥样硬化”(glomerular atherosclerosis, GAS) 这一概念^[3],其发病早

期,血浆中胆固醇及 LDL 浓度增高为主要启动因子。炎症是该事件过程中的一个加速因子,其中生物效应受 NF- κ B 调控, MCP-1 分子^[4]不仅作为病变的标志物,其本身还可作为介质与黏附分子共同参与脂质介导的肾小球病理损害^[5]。

本研究选用喂养大剂量 VD₃ + 高胆固醇、高脂混合饲料方式制备食饵性 GAS 实验性大鼠模型,建模 4 周后呈现出高脂血症征象,血清中 TC 及 LDLC 分别高于正常 3.172 和 7.286 倍,免疫组织化学试验发现 NF- κ B 的阳性表达主要分布在肾小球血管密集区域及足细胞处,显见于胞核,并与血脂指标和 MCP-1 分泌水平增高成显著正相关关系。提示氧化型脂蛋白刺激的 MCP-1 表达在很大程度上触发肾小球细胞内炎症级联反应,而 NF- κ B 活化则加速脂质介导的肾小球损伤。

黄芩苷作为黄酮类化合物具有抗炎、降脂、抗氧化等广泛的生物活性,在体外可通过阻断脂多糖诱导的血管内皮细胞 NF- κ B 活化发挥抗炎作用^[6],但这种有效成分是否能通过体内途径对肾脏 NF- κ B 活化产生相同作用尚不明确。本研究发现在大鼠制模同时给予灌胃黄芩苷可降低体内血脂指标,抑制 NF- κ B 活化,减少 MCP-1 分泌,表明黄芩苷能较好改善脂质代谢紊乱,减弱氧化应激和炎症反应,对预防肾小球 As 延缓早期肾小球 As 病理损害及保护肾脏功能具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 李学旺,李航. 炎症是脂质异常介导的动脉粥样硬化和肾脏损害的中心环节[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21(9): 499-501.
- [2] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(3): 249-253.
- [3] Li H, Zhang L. Lipid inflammation and glomerulosclerosis international [J]. J Urol Nephrol, 2006, 26(6): 827-831.
- [4] Hsada Y, Sakurai H, Sugaya T. Cell to cell interaction between mesangial cells and macrophages induces the expression of monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor- κ B activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 269: 309-316.
- [5] Khan SR, Cook HT, Bhargava G, et al. Antibody blockade of TNF- α reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis [J]. Kidney Int, 2005, 67(5): 1812-1820.
- [6] 孔祥丽,阎蓉华,李绚,等. 双黄连注射液对 LPS 诱导的人血管内皮细胞 NF- κ B 活化的影响[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(6): 608-611.

(此文编辑 许雪梅)