

熊果酸对阿霉素肾病小鼠肾脏病变的影响

福建医科大学附属第二医院肾脏内科 (泉州 362000) 李渊根 郑兴中¹ 黄荣桂²

【摘要】 目的 研究熊果酸 (ursolic acid, UA) 对小鼠阿霉素肾病 (adriamycin-induced nephropathy, ADN) 的影响, 探讨其可能的机制。**方法** 40 只 Balb/c 小鼠, 随机分为正常对照组 (Normal 组), 阿霉素肾病组 (ADN 组), 低剂量熊果酸组 (LU+ADN 组), 高剂量熊果酸组 (HU+ADN 组)。单次注射阿霉素创建阿霉素肾病模型, 以熊果酸为干预因素, 测定尿蛋白总量, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾脏病变情况, 免疫组织化学法检测 TGF- β 1 在肾小管间质中的表达。**结果** 1) 小鼠 24 h 尿蛋白总量: ADN 组小鼠较 Normal 组显著升高 ($P < 0.05$), HU+ADN 组较 ADN 组显著下降 ($P < 0.05$)。2) HE 染色: ADN 组出现显著的肾小管上皮细胞肿胀, 管腔扩张等病变。与 ADN 组相比, HU+ADN 组肾小管间质病变较轻。3) 免疫组化染色半定量分析: ①与 Normal 组比, ADN 组肾间质表达 TGF- β 1 显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。②与 ADN 组比, LU+ADN 组 TGF- β 1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); HU+ADN 组小鼠 TGF- β 1 表达显著下降, 两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 高剂量熊果酸 (50 mg/kg) 可以减少阿霉素肾病小鼠的尿蛋白, 抑制阿霉素肾病小鼠肾小管间质 TGF- β 1 蛋白的表达, 发挥肾脏保护作用。

【关键词】熊果酸; 阿霉素肾病; TGF- β 1; 肾小管间质纤维化

【中图分类号】R96 **【文献标识码】**B **【文章编号】**1002-2600(2018)06-0123-04

Intervention effect of ursolic acid on adriamycin-induced nephropathy in mice LI Yuangen, ZHENG Xing-zhong, HUANG Ronggui. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of ursolic acid on adriamycin-induced nephropathy in mice. **Methods** Forty Balb/c mice were randomly divided into control group (Normal group), ADN group, low dose of UA group (LU+ADN group), high dose of UA group (HU+ADN group). The ADN model was established by treating with a single tail vein injection of ADR, UA was regarded as the interference factor. The Normal group received a single tail vein injection of saline only. Twenty four-hour urine was collected by urine protein tests. HE staining was used to observe the tubulointerstitial lesions, and immunohistochemical staining detected the expression of TGF- β 1 in tubulointerstitium. **Results** 1) 24-hour urinary protein excretion: At day 7 after ADR injection, albuminuria was most evident in ADN group as compared with Normal group ($P < 0.05$), and was attenuated in HU+ADN group as compared with ADN group ($P < 0.05$). 2) HE staining: The renal tubulointerstitial lesions of ADN group mice were obvious, with swelling of tubular epithelial cells, tubular dilation obviously. The tubulointerstitial lesions of HU+ADN group mice were relatively relieved. 3) The semi-quantitative analysis of immunohistochemical staining: Compared with Normal group, the expression level of TGF- β 1 in renal tissue of ADN group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with ADN group, difference of the expression level of TGF- β 1 in renal tissue of LU+ADN group had no statistics significance ($P > 0.05$). Compared with ADN group, the expression level of TGF- β 1 in renal tissue of HU+ADN group was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The high concentration of UA (50 mg/kg) has a protection effect on mice with adriamycin-induced nephropathy by reducing urinary protein excretion and inhibiting the TGF- β 1 protein expression in tubulointerstitial.

【Key words】ursolic acid; adriamycin-induced nephropathy; TGF- β 1; renal tubulointerstitial fibrosis

1 药学部

2 通信作者

肾纤维化 (renal fibrosis) 是各种慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 进展到终末期肾脏病 (end-stage renal disease, ESRD) 的共同途径。防治肾纤维化的发生发展、延缓 CKD 进展是临床亟待解决的课题。熊果酸存在于多种天然植物之中, 为五环三萜类化合物。既往研究表明熊果酸具有抗肿瘤、抗器官纤维化以及抗 CKD 患者肌肉萎缩等广泛的生物活性。本实验通过单次尾静脉注射阿霉素 (adriamycin, ADR) 10 mg/kg, 建立小鼠阿霉素肾病模型, 研究熊果酸对小鼠 ADN 的影响, 并探讨其对肾纤维化可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料:

1.1.1 实验动物: 健康雄性 Balb/c 小鼠 40 只 (清洁级), 上海斯莱克实验动物公司, 许可证号: SCXK (沪) 2012-0002, 合格证号: 2007000-555455。动物使用协议已由实验动物伦理审查委员会批准, 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 实验试剂: 熊果酸 (纯度 $\geq 98\%$, Sigma 公司)。注射用盐酸多柔比星 (阿霉素): 浙江海正药业股份有限公司 (10 mg/瓶, 批号: 120701)。G250 考马斯亮蓝试剂盒 (厦门泰京生物技术有限公司)。TGF- $\beta 1$ 抗体 (兔抗小鼠 IgG 多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司)。即用型非生物素免疫组化 EliVision TM plus 检测试剂盒、二甲基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (福州迈新生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器: 7230 分光光度计 (厦门分析仪器厂), Nikon80i 光学显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.2 方法:

1.2.1 实验分组及干预: 40 只 Balb/c 小鼠, 适应性喂养 3 d, 随机分为 4 组: 1) 正常对照组 (Normal 组, $n = 10$): 等量的 14% 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO), 腹腔注射 qd; 2) 阿霉素肾病组 (ADN 组, $n = 10$): 等量的 14% DMSO, 腹腔注射 qd; 3) 低剂量熊果酸组 (LU+ADN 组, $n = 10$): 25 mg/(kg·d) 熊果酸, 腹腔注射 qd; 4) 高剂量熊果酸组 (HU+ADN 组, $n = 10$): 50 mg/(kg·d) 熊果酸, 腹腔注射 qd。实验第 1~18 天连续经腹腔注射给药。使用 14% DMSO 配置熊果酸混悬液, 根据体质量给药, 每 3 d 称取 1 次体质量, 据体质量调整药物剂量, 给药体积 0.1 mL/10 g。实验第 18 天处死小鼠, 留取标

本检测。

1.2.2 阿霉素肾病模型制备过程: 实验第 4 天进行阿霉素肾病造模, 75% 酒精消毒皮肤, ADN 组、LU+ADN 组及 HU+ADN 组经尾静脉单次注射阿霉素 10 mg/kg, Normal 组予单次注射等量生理盐水。

1.2.3 小鼠 24 h 尿蛋白定量: 造模后第 7 天, 收集 24 h 尿量, 按 G250 考马斯亮蓝试剂盒说明书步骤进行 24 h 尿蛋白总量测定。

1.2.4 肾组织苏木素-伊红 (HE) 染色: 造模后第 14 天, 处死, 福尔马林固定左肾组织, 石蜡包埋切片, HE 染色后, 光镜下观察肾组织。

1.2.5 免疫组织化学染色检测肾组织 TGF- $\beta 1$ 的表达及半定量分析: 采用即用型非生物素免疫组化染色法 (即 Elivison 二步法), 按试剂盒说明书操作。应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析, 于 $40\times$ 放大倍数下, 每张病理切片随机选取 10 个不重叠视野, 避开肾小球, 统计免疫组化染色阳性信号面积占该视野总面积的百分比, 即平均阳性染色面积百分比 (average positive staining area percentage, APSAP), 以反映 TGF- $\beta 1$ 在肾组织中的表达。

1.3 统计学分析: 实验结果以数据和图表表示, 测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行统计学处理。多组比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA); 组间两两比较采用 LSD 检验。方差不齐多组间比较采用秩和检验 (Kruskal-Wallis H 检验), 检验标准以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

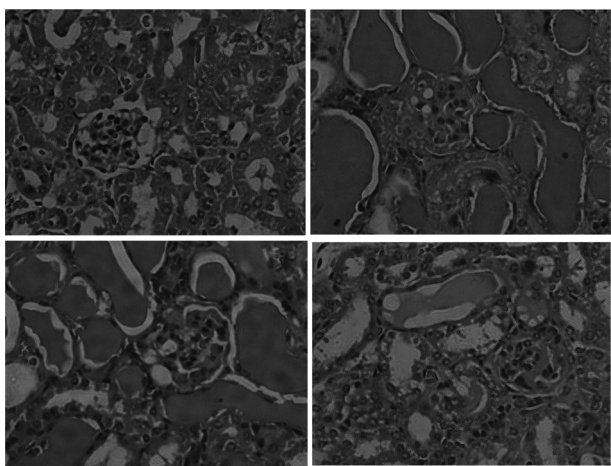
2 结果

2.1 小鼠 24 h 尿蛋白定量: Normal 组 24 h 尿蛋白定量测定结果为 (1.15 ± 0.44) mg ($n = 10$); ADN 组为 (4.34 ± 1.52) mg ($n = 9$); LU+ADN 组为 (4.18 ± 2.43) mg ($n = 10$); HU+ADN 组为 (2.03 ± 0.95) mg ($n = 10$)。与 Normal 组相比, ADN 组小鼠 24 h 尿蛋白总量明显增高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 ADN 组相比, LU+ADN 组 24 h 尿蛋白总量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HU+ADN 组 24 h 尿蛋白总量明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 肾组织病理:

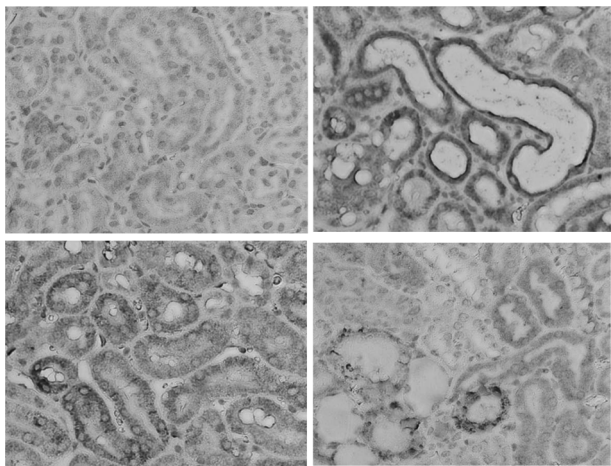
2.2.1 HE 染色光镜下表现: Normal 组肾组织形态学正常 (图 1 左上)。ADN 组可见球囊粘连, 部分血管袢血管腔缩小或闭塞, 血管袢塌陷萎缩; 肾

小管上皮细胞明显空泡样改变, 部分上皮细胞脱落, 管腔扩大, 可见大量均质红染的蛋白管型 (图 1 右上)。与 ADN 组相比, LU+ADN 组肾脏损害无明显改善 (图 1 左下); HU+ADN 组肾小球球囊粘连较轻, 肾小管上皮细胞可见空泡变性、脱落或缺失程度也较轻 (图 1 右下)。



注: 左上 Normal 组, 右上 ADN 组, 左下 LU+ADN 组, 右下 HU+ADN 组。

图 1 各组小鼠肾脏病理镜检图 (HE ×400)



注: 左上 Normal 组, 右上 ADN 组, 左下 LU+ADN 组, 右下 HU+ADN 组。

图 2 各组小鼠肾组织 TGF-β1 免疫组化染色图 (×400)

2.2.2 肾组织 TGF-β1 免疫组织化学染色: Normal 组肾小管间质区 TGF-β1 平均阳染面积百分比 (%) 为 0.015 ± 0.019 。ADN 组为 0.262 ± 0.212 。LU+ADN 组为 0.172 ± 0.175 。HU+ADN 组为 0.058 ± 0.048 。与 Normal 组比较, ADN 组 TGF-β1 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 ADN 组比较, LU+ADN 组

TGF-β1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); HU+ADN 组 TGF-β1 表达明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

既往已有大量研究表明足细胞、基底膜损伤引起滤过膜屏障破坏, 大量蛋白尿漏出, 系膜细胞过度活化及增殖, 合成大量细胞外基质, 最终导致肾小球硬化和肾小管间质纤维化。ADR 是临床一种常用的蒽环类抗肿瘤药物, 通过细胞毒作用直接损害肾小球内皮细胞^[1], 破坏肾小球滤过膜屏障, 并可过度激活系膜细胞及单核细胞、巨噬细胞等细胞, 诱导产生 IL-1β、TNF-α、MCP-1 等多种细胞因子和炎症介质, 促使肾小球系膜细胞增殖和系膜基质增多, 引起肾小管间质纤维化^[2], 逐步进展为 ESRD。新近的研究表明熊果酸具有抗氧化^[3]、抗炎^[4]等作用。熊果酸对 ADN 影响的文献报道较少。因此, 我们选用 Balb/c 小鼠创建 ADN 模型, 以探讨熊果酸对 ADN 的肾脏保护作用及其机制。

本研究观察到造模后第 7 天, 实验小鼠出现大量蛋白尿, 证明造模成功。造模后第 14 天, 造模组肾脏病理提示局灶节段性球囊粘连; 肾小管上皮细胞空泡样改变, 管腔内可见大量蛋白管型, 说明阿霉素肾病模型造模成功。LU+ADN 组肾脏病理改善不明显, 而 HU+ADN 组尿蛋白明显减少, 肾小球硬化、肾小管损伤减轻, 说明高剂量熊果酸具有减少尿蛋白及肾脏保护作用。

TGF-β 是一种多效性的细胞因子, 以自分泌或旁分泌的方式, 发挥调节细胞增殖、分化、凋亡等作用。TGF-β1/Smad 信号转导通路是介导肾纤维化的主要通路, 既往在单侧输尿管梗阻等多种肾纤维化模型中得到证实^[5]。本研究通过免疫组织化学半定量分析肾小管间质 TGF-β1 平均阳性染色面积百分比, 观察到 HU+ADN 组与 ADN 组相比, TGF-β1 表达显著减少, 结合肾脏病理示高剂量熊果酸组肾脏损伤改善, 提示高剂量熊果酸可抑制 ADN 的肾小管间质纤维化进程, 并存在剂量依赖性。这与本实验室先前研究观察到熊果酸抑制体外培养的系膜细胞增殖, 抑制 TGF-β1 蛋白表达的结果相符合^[6]。此外, 熊果酸可通过抑制 TGF-β1 表达减轻腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中肾组织的纤维化进展^[7]。熊果酸可抑制 TGF-β 等炎症因子的表达, 改善 CKD 患者肌肉萎缩的进展^[8]。阿霉素肾病小鼠出现大量蛋白尿, 提示存在足细胞损害。有研究表明熊果酸可抑制 microRNA-21 (miR-21)

表达, 增加磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN) 表达, 抑制异常激活的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 调节细胞自噬 (autophagy), 减轻足细胞损伤^[9]。上述研究表明, 熊果酸减轻足细胞损伤, 抑制肾纤维化的作用, 至少有部分是通过 TGF- β 1 途径实现的。

综上所述, 高剂量熊果酸可减少 ADN 小鼠的蛋白尿, 减少肾小管间质 TGF- β 1 表达, 抑制或延缓肾小管间质纤维化进展过程。熊果酸有望成为一种抗肾纤维化的新药, 其肾脏保护作用的具体机制尚不完全明确, 有待进一步研究阐明。

参考文献

- [1] Sun Y B, Qu X, Zhang X, et al. Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): 55027.
- [2] Liu S, Jia Z, Zhou L, et al. Nitro-oleic acid protects against adriamycin-induced nephropathy in mice [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305 (11): F1533-41.
- [3] Xu H L, Wang X T, Cheng Y, et al. Ursolic acid improves di-

abetic nephropathy via suppression of oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 915-921.

- [4] Zhang Z, Zhang H, Chen R, et al. Oral supplementation with ursolic acid ameliorates sepsis-induced acute kidney injury in a mouse model by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (5): 7142-7148
- [5] Zhou Y, Mao H, Li S, et al. HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21: 598-609.
- [6] 林志民, 李月婷, 郑兴中, 等. 熊果酸含药血清对大鼠肾小球系膜细胞增殖及 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37 (10): 938-941.
- [7] Yu R, Chen J A, Xu J, et al. Suppression of muscle wasting by the plant-derived compound ursolic acid in a model of chronic kidney disease [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017, 8 (2): 327-341.
- [8] Thakur R, Sharma A, Lingaraju M C, et al. Ameliorative effect of ursolic acid on renal fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 972-980.
- [9] Xu L, Fan Q, Wang X, et al. Ursolic acid improves podocyte injury caused by high glucose [J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32 (8): 1285-1293.