

山茱萸对肾间质纤维化的保护作用及机制研究

陈 焯,朱春玲,严 瑞*,刘晓霞,宋文玉

贵州医科大学附属医院肾病风湿科,贵阳 550004

摘要:为评价山茱萸对肾间质纤维化的保护作用及其作用机制。36只5周龄体重相近的雄性SD大鼠随机分为假手术组(S组)、模型组(U组)、山茱萸(300 mg/Kg)干预组(D组)。分别于术后第7 d、第14 d处死三组中的6只SD大鼠。观察肾组织病理改变和肾间质纤维化程度、YKL-40、 β -catenin、Wnt4蛋白表达。结果显示D组各时间点肾小管间质损伤指数、肾间质纤维化指数、YKL-40、 β -catenin均低于同期U组,D14组高于D7组($P < 0.05$)。而D组Wnt4和 β -catenin、YKL-40蛋白表达量显著降低,与U组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。表明山茱萸对肾脏具有一定的保护作用。

关键词:YKL-40;UUO模型大鼠;肾间质纤维化;山茱萸;干预作用

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.11.021

Protective Effect of *Cornus officinalis* on Renal Interstitial Fibrosis and Its Mechanism

CHEN Ye, ZHU Chun-ling, YAN Rui*, LIU Xiao-xia, SONG Wen-yu

Kidney Rheumatology Affiliated Hospital of Guizhou University, Guiyang 550004, China

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the protective effect of *Cornus officinalis* on renal interstitial fibrosis and its mechanism. Thirty-six 5-week-old male SD rats with similar body weight were randomly divided into sham group (S group), model group (U group) and *C. officinalis* (300 mg/Kg) in the intervention group (group D). Six SD rats from each of the three groups were sacrificed respectively at the first 7 days and the first 14 days. Pathological changes of renal interstitial renal fibrosis and YKL-40, β -catenin, Wnt4 protein were observed. The results showed that among D group at each time point tubulointerstitial damage index, renal interstitial fibrosis index, YKL-40, β -catenin were lower than that in U group at the same period, and the indicators in D14 group were all higher than that in D7 group ($P < 0.05$). While Wnt4 and β -catenin, YKL-40 protein expression in group D was significantly decreased compared with the U group ($P < 0.05$). It showed that *C. officinalis* had a protective effect on kidney.

Key words: YKL-40; UUO model rats; renal interstitial fibrosis; *Cornus officinalis*; intervention

慢性肾脏疾病(CKD)常缓慢发展,往往导致广泛的肾间质纤维化(RIF),最终发展为终末期肾衰。肾脏纤维化的病理学特征主要表现为肾小球硬化、肾小管间质纤维化和肾内血管硬化^[1,2]。肾小管间质病变程度对10年肾脏存活率具有决定性影响,对肾脏预后的影响较肾小球病变更为严重。目前,肾间质纤维化尚无有效的治疗方法。因此,寻找有效的能够干预肾间质纤维化的药物,从而减轻或逆转肾间质纤维化,阻止残余肾功能下降显得尤为重要和迫切。本研究通过建立SD大鼠UUO模型,观察

山茱萸对其肾间质纤维化的影响及其肾组织中YKL-40、 β -catenin等表达的影响,旨在探讨肾间质纤维化的作用机制及山茱萸对其的治疗作用。

1 材料与仪器

1.1 试验动物

7周龄雄性清洁级SD大鼠36只,体重200~250 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(渝)2007-0003,使用许可证号:SYXK。

1.2 药品与试剂

山茱萸(贵州省同济堂中药有限公司,批号:120818)。YKL-40(bs-1093R)、 β -catenin、SABC免疫组化试剂盒、DAB显色剂均购自北京博奥森生物

科技有限公司。细胞总蛋白提取试剂盒购自美国 Pierce 公司提供;兔抗小鼠 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40、 β -actine 一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗均由美国 Cell Signaling 公司提供;ECL 化学发光液由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.3 仪器

组织自动脱水机(型号 ZT-12P2),石蜡包埋机(型号 YB-6LF),石蜡切片机(型号 Leica RM 2235),电热恒温干燥箱(型号 202-O),生物组织摊烤片机(型号 YT-7F),光学显微镜(型号 OLYMPUS BX51)。

2 实验方法

2.1 试剂的配制

山茱萸研磨成粉状,与双蒸水配成混悬液,按 300 mg/Kg/d 灌胃,即配即用。

2.2 动物模型制作及分组

参照文献方法^[3]进行 UUO 模型制备,大鼠适应性饲养 1 周后,测体重,尿蛋白阴性后,随机分为假手术组(S 组,12 只),模型组(U 组,12 只)、山茱萸(300 mg/Kg)干预组(D 组,12 只),并据造模及药物干预时间再分为 U_7 天组、 U_{14} 天组、 D_7 天组、 D_{14} 天组,同时假手术组相应为 S_7 天组、 S_{14} 天组相对应。模型组(U 组)和山茱萸干预组(D 组)予 10% 水合氯醛(2 mL/Kg)腹腔注射麻醉后,无菌手术打开腹腔分离左侧输尿管近肾盂端,用 4 号线结扎并剪断输尿管,分层缝合关闭腹腔。假手术组(S 组)只分离但不结扎和剪断输尿管。各组大鼠均自由饮水及进食。术后第 1 d 开始,用药组(D 组)胃注山茱萸饮片液(300 mg/Kg),余两组胃注同等量生理盐水。

2.3 标本制作及组织病理学观察

造模后 7、14 d 分别处死各组大鼠,取左侧肾脏立即置于 10% 福尔马林中固定 48 h,后再进一步脱水、石蜡包埋、切片(厚度 3 μ m)等行苏木精-伊红(HE)染色观察肾组织病理改变。Masson 染色观察肾间质纤维化程度。免疫组化染色检测 YKL-40、 β -catenin 的表达水平。蛋白免疫印记法检测大鼠肾组织 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白表达。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析处理。计量资料用均数 \pm 标准差表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA),组间两两比较方差齐者用 LSD 法,如方差不齐,采用 Tam-

hane's T2 法;各项指标之间做 Pearson 相关分析。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 造模后情况

各组动物存活率均为 100%,成功制备 UUO 模型,分别于术后 7、14 d 取肾,肉眼可观察到手术侧肾脏随着时间推移逐渐增大,颜色较对侧变浅,肾盂肿大明显,肾皮质部分逐渐变薄,其内充满尿液,表明成功建立单侧输尿管梗阻模型。

3.2 SD 大鼠肾脏的组织病理学改变

肉眼观察,S 组大鼠左侧肾脏随着时间推移未发生明显变化,肾脏大小、形态正常,颜色呈深红色,表面光滑无颗粒感,与右侧肾脏无明显差异。模型组及干预组大鼠左侧肾脏体积较同期 S 组及右侧肾脏增大,梗阻上段输尿管扩张明显,颜色变暗淡,皮髓质变薄。随着时间的推移,模型组与干预组大鼠梗阻输尿管扩张越来越严重,颜色淡红,皮髓质明显变薄,内含较多尿液。HE 染色显示,S 组各时间点肾小球、肾小管结构正常,肾间质无纤维化、水肿及炎性细胞浸润。 U_7 组肾小管管腔扩张,肾小管上皮细胞可见较多空泡变性,肾间质轻度纤维化、水肿,可见淋巴细胞、单核细胞浸润。 U_{14} 组肾小管呈囊性扩张,部分萎缩坏死,弥漫性上皮细胞空泡变性,与小管基底膜弥漫性分离,肾间质纤维化程度加重,大量单核细胞、淋巴细胞浸润,可见蛋白尿管型、红细胞管型。D 组各时间点病变同 U 组类似,其程度均较同期 U 组减轻,但仍较 S 组病变重。与 S 组比较,U 组的肾小管间质损伤指数(TDI)显著升高($P < 0.05$);而经山茱萸干预后,D 组 TDI 显著降低,与 U 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

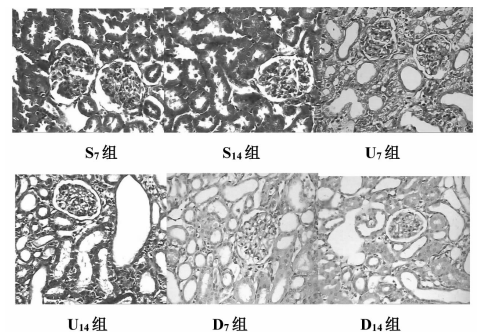


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色($\times 200$)

Fig. 1 HE staining of renal tissue in each group ($\times 200$)

表 1 各组大鼠 TDI 和 TFI 的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 1 Comparison of TDI and TFI in each group ($\bar{X} \pm S$)

组别 Group	例数 n	肾小管间质损伤指数 TDI		肾间质纤维化指数 TFI	
		术后 7 d	术后 14 d	术后 7 d	术后 14 d
		7 days after surgery	14 days after surgery	7 days after surgery	14 days after surgery
S 组	6	1.11 ± 0.7820	1.00 ± 0.5000	0.11 ± 0.3330	0.11 ± 0.3330
U 组	6	10.8333 ± 0.5774 *	16.2500 ± 0.6216 *▲	1.8333 ± 0.3892 *	2.9167 ± 0.2887 *▲
D 组	6	8.8333 ± 0.5774 *▼	9.7500 ± 0.6216 *▼▲	1.2500 ± 0.4523 *▼	2.1667 ± 0.5774 *▼▲

注: * $P < 0.05$ vs S group; ▼ $P < 0.05$ vs U group; ▲ $P < 0.05$ vs D^{7th} day group.

3.3 Masson 染色

S 组可见肾小管肾小球形态结构正常,肾间质无纤维阳性染色,各时间点无明显差异。U7 组肾小管、肾间质可见纤维阳性染色,肾小管轻度节段分离;U14 组较 U7 组肾间质纤维阳性染色面积增大,呈束状、网状分布,肾小管弥漫性分离,部分肾小管萎缩。D7 组肾间质亦可见纤维阳性染色,面积较 U7 组减少。D14 组肾间质可见纤维阳性染色面积,呈束状、网状分布,肾小管仍有弥漫性分离,肾小管可见萎缩,但程度较 U14 组减轻(见图 2)。与 S 组比较,U 组的肾间质纤维化指数(TFI)显著升高($P < 0.05$);而经山茱萸干预后,D 组 TFI 显著降低,与 U 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2,表 1。

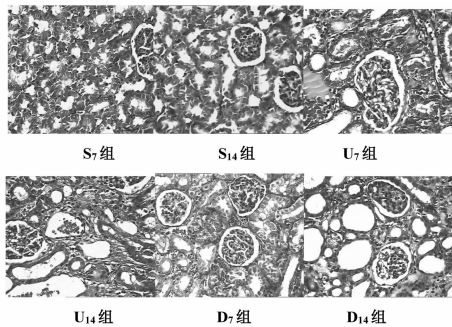


图 2 各组大鼠肾组织 Masson 染色 (×200)

Fig. 2 Masson staining of renal tissue in each group (×200)

3.4 免疫组化法检测 YKL-40 的表达

S 组肾间质见少量的 YKL-40 表达,7、14 d 时两组表达量差异无统计学意义($P > 0.05$); U₇ 组可见 YKL-40 在肾小球、肾间质、肾小管上皮细胞胞浆均有阳性表达,其阳性染色部位平均光密度值较 S₇ 组升高,U₁₄ 阳性染色部位平均光密度值较 S₁₄ 组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$); D 组仍可见肾间质、肾小管上皮细胞浆、肾小球 YKL-40 的阳性表达,但较 U 组同期各个时间点表达显著降低($P < 0.05$); 但 D₇ 组 YKL-40 的表达仍高于 S₇ 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),D₁₄ 组 YKL-40 的表达高于 S₁₄ 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(见图 3、表 2)。

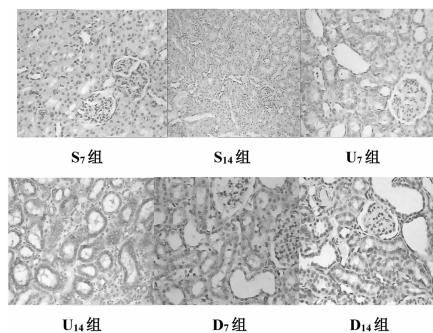


图 3 各组大鼠肾组织免疫组化之 YKL-40 的表达

Fig. 3 IHC of YKL-40 expression in the renal tissues of rats

表 2 免疫组化法测定各组大鼠肾组织 YKL-40 和 β -catenin 表达 ($\bar{X} \pm S$)

Table 2 Expression of YKL-40 and β -catenin in renal tissues of rats with immunohistochemistry ($\bar{X} \pm S$)

组别 Group	例数 n	肾小管间质损伤指数 TDI		肾间质纤维化指数 TFI	
		术后 7 天	术后 14 天	术后 7 天	术后 14 天
		7 days after surgery	14 days after surgery	7 days after surgery	14 days after surgery
S 组	6	0.0207 ± 0.0004	0.0178 ± 0.0004	0.0149 ± 0.0003	0.0155 ± 0.0004
U 组	6	0.0751 ± 0.0028 *	0.1728 ± 0.0032 *▲	0.0750 ± 0.0028 *	0.1583 ± 0.0038 *▲
D 组	6	0.0507 ± 0.0009 *▼	0.0479 ± 0.0012 *▼▲	0.0622 ± 0.0030 *▼	0.0547 ± 0.0023 *▼▲

注: * $P < 0.05$ vs S group; ▼ $P < 0.05$ vs U group; ▲ $P < 0.05$ vs D^{7th} day group.

3.5 免疫组化法检测 β -catenin 的表达

β -catenin 在 S 组各个时间点大鼠肾间质内均可见少量表达,随着时间的推移, β -catenin 的表达未见明显增加,差异无统计学意义($P > 0.05$);U 组各个时间点上均可见 β -catenin 在肾间质、肾小管上皮细胞上阳性表达,其平均光密度值显著高于 S 组同时时间点,差异有统计学意义($P < 0.05$); U_{14} 平均光密度值高于 U_7 平均光密度值,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组各个时间点上可见 β -catenin 在肾间质及肾小管上皮细胞上阳性表达,但 D_{14} 平均光密度值显著低于 D_7 光密度值,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 D_{14} 光密度值低于 U_{14} 光密度值,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(见图 4,表 2)。

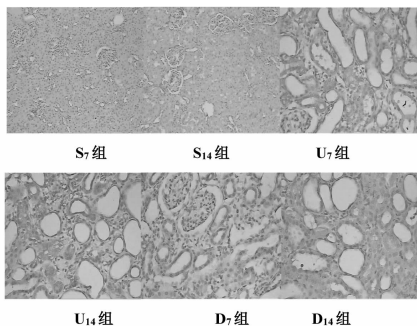


图 4 各组大鼠肾组织免疫组化之 β -catenin 的表达

Fig. 4 IHC of β -catenin expression in the renal tissues of rats

3.6 蛋白免疫印记法检测大鼠肾组织 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白表达

与 S 组比较,U 组 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$);而经山茱萸干预后,D 组 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白表达量显著降低,与 U 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5,表 3。

3.7 相关性分析

经相关性分析,TDI 与 Wnt4、 β -catenin、YKL-40

表 3 各组大鼠肾组织蛋白免疫印记之 Wnt4 和 β -catenin 蛋白、YKL-40 的表达($\bar{X} \pm S$)

Table 3 The expression of Wnt4, β -catenin and YKL-40 protein in renal tissues of rats($\bar{X} \pm S$)

组别 Group	Wnt4/ β -Actin	β -catenin/ β -Actin	YKL-40/ β -Actin
S 组	0.0139 \pm 0.0047	0.0149 \pm 0.0032	0.0157 \pm 0.0039
U 组	0.6984 \pm 0.0531 *	0.9761 \pm 0.1873 *	0.4714 \pm 0.0614 *
D 组	0.417 \pm 0.0216 *▼	0.398 \pm 0.153 *▼	0.2145 \pm 0.0199 *▼

注: * $P < 0.05$ vs S group; ▼ $P < 0.05$ vs U group。

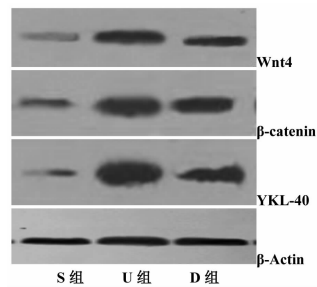


图 5 各组大鼠肾组织蛋白免疫印迹之 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白的表达

Fig. 5 Western blotting of Wnt4, β -catenin and YKL-40 in renal tissue of rats

均呈显著正相关($P < 0.001$);TFI 与 Wnt4、 β -catenin、YKL-40 均呈显著正相关($P < 0.001$);YKL-40 与 Wnt4、 β -catenin 呈显著正相关($P < 0.001$); β -catenin 与 Wnt4 呈显著正相关($P < 0.001$)。

4 讨论

几丁质酶样蛋白 YKL-40 是一个相对分子量为 40000 的肝磷脂和壳质链接的凝集素。活化的巨噬细胞、中性粒细胞、血管平滑肌细胞、关节炎患者的软骨细胞等多种细胞均可分泌 YKL-40。体外实验中,其诱导巨噬细胞及单核细胞成熟,并由后期分化的巨噬细胞和活化的巨噬细胞分泌,与先天免疫系统及胞外基质重塑有关^[4,5]。健康人血浆中虽然存在 YKL-40,但浓度较为固定,不受生理活动影响。有研究表明,YKL-40 以一种剂量依赖方式刺激组织细胞如成纤维细胞、滑膜细胞及软骨细胞等人体的连接组织细胞增生,同时还可调节成纤维细胞及滑膜细胞的有丝分裂,在细胞外基质形成和基质重构中发挥重要作用。同时,Wnt/ β -catenin 信号途径在肾脏胚胎发育和肾脏肿瘤的发生中均起着关键作用。研究发现,在 wnt7b 基因敲除的小鼠急性肾损伤模型中发现肾小管损伤严重、上皮细胞再生延迟,提示 Wnt7b 可能参与了肾小管上皮细胞损伤后的修复功能^[6]。而 Wnt 信号通路及其效应器 β -cat 被证实伤口愈合过程中促进纤维增生^[7,8]。在 UUO 大鼠模型中 wnt/ β -catenin 信号通路异常激活,并参与肾间质纤维化的发生发展。

现代药理研究已知,山茱萸的果肉含山茱萸环烯醚萜总苷、莫罗忍冬苷、熊果酸、没食子酸、维生素 A 等,具有调节免疫、抗炎抗氧化、降血糖等作用^[9]。研究发现,山茱萸环烯醚萜总苷不仅能显著降低 DN 大鼠的尿微量白蛋白,减轻肾脏病理学改变,并可通过抑制氧化应激来保护肾脏组织。体外实验发

现,山茱萸环烯醚萜苷对抗 AGEs 对肾小球系膜细胞损伤的机制,可能是通过抑制氧化应激保护肾小球系膜细胞免受 AGEs 的损害^[10]。

本研究结果显示,假手术组大鼠肾组织肾小管上皮及间质细胞中即有少量 YKL-40 表达,其平均光密度约为 0.0193 ± 0.0004 , 随时间增加表达相对恒定,无明显变化。目前有研究发现健康人血浆中就存在 YKL-40,且浓度较为固定,不受生理活动影响^[11],上述实验结果与其他学者观察到的结果一致,说明 YKL-40 在正常肾组织中可能起维持特定生理功能的作用。模型组随着时间的增加,肾小管上皮及间质细胞中 YKL-40 阳性表达明显增强, U_7 天组与 U_{14} 天组分别与假手术对应组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2~3), U_7 天组与 U_{14} 天组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2~3)。随着肾间质纤维化的进展,YKL-40 的表达在显著增强的同时,还与 Wnt4、 β -Cats 呈显著正相关关系,因而提示其可能参与了肾间质纤维化发生发展。提示 YKL-40 可能是一个内源性的促纤维化细胞因子。

目前对 YKL-40 的研究尚不够深入,其参与的信号转导通路目前尚未明确。Wnt4 及 β -catenin 信号通路是重要的反应肾间质纤维化过程的信号通路。模型组各个时间点上均可见 β -catenin 在肾间质、肾小管上皮细胞上阳性表达,其平均光密度值显著高于同期假手术组($P < 0.05$); U_{14} 天组平均光密度值高于 U_7 天组($P < 0.05$),同时,与 S 组比较,U 组 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$);而经山茱萸干预后,D 组 Wnt4 和 β -catenin、YKL-40 蛋白表达量显著降低,与 U 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与免疫组化检测结果相一致,提示 Wnt4 及 β -catenin 信号通路参与了肾间质纤维化的发生发展过程,同时还发现,YKL-40 与 β -Cats 呈显著正相关关系($r = 0.987, P < 0.001$),提示 YKL-40 与该信号通路存在正向联系的可能性极大,但其具体作用环节及机制,以及在此通路中所处的上下游位置,尚待日后进一步深入研究。

研究结果还显示,药物治疗组与同期模型组比较,YKL-40、 β -catenin 表达均有所下降($P < 0.05$),说明山茱萸治疗后,肾间质纤维化有所减轻,推测其对肾脏具有一定的保护作用,其机制可能通过减少 Wnt4 及 β -catenin 信号通路的激活,下调 YKL-40 的激活和释放来发挥作用。但本研究仅对 YKL-40 在肾间质纤维化中的作用做了初步探索,未对其发病

的具体信号通路及作用环节进行深入研究,且缺乏 YKL-40 敲除老鼠模型的相关数据作为参照,在下一步的研究中拟通过 YKL-40 敲除老鼠模型研究 YKL-40 在肾间质纤维化中的作用,以及山茱萸作用的具体通路进行进一步深入研究。

参考文献

- 1 Wang Z(王箬),Liang LJ(梁丽娟),Wang CH(王聪慧),*et al.* Effect of shenluotong decoction on renal interstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. *Chin J Integr Med* (中国中西医结合杂志),2014,34:1238-1244.
- 2 Chen X,Zhouhua W,Jie Z,*et al.* Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway. *Int J Nanomed*,2014,10:1-22.
- 3 Zhang XZ(张新志),He LQ(何立群). Recent advancement on animal models of renal tubulo interstitial fibrosis. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药),2010,21:969-971.
- 4 Zhang JP,Yuan HX,Kong WT,*et al.* Increased expression of chitinase 3-like 1 and microvessel density predicts metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol*,2014,35:12131-12137.
- 5 Akiyama Y,Ashizawa T,Komiyama M,*et al.* YKL-40 down-regulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. *Oncol Rep*,2014,32:159-166.
- 6 Singer AJ,Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl Med*,1999,341:738-746.
- 7 Cheon SS,Cheah AY,Turley S,*et al.* beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99:6973-6978.
- 8 Cheon SS,Nadesan P,Poon R,*et al.* Growth factors regulate beta catenin mediated TCF-dependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing. *Exp Cell Res*,2004,293:267-274.
- 9 Li LH(李丽华),Xu HQ(许惠琴),Shi Y(时艳). The effects of dogwood iridoid glycosides on kidney morphology and Na + K + -ATP enzyme activity on diabetic rat. *J Yunnan Coll Chin Med* (云南中医学院学报),2005,28(4):43-45.
- 10 Tiriveedhi V,Upadhya GA,Busch RA,*et al.* Protective role of bortezomib in steatotic liver ischemia/reperfusion injury through abrogation of MMP activation and YKL-40 expression. *Transpl Immunol*,2014,30(2-3):93-98.
- 11 Brix JM,Höllerl F,Koppensteiner R,*et al.* YKL-40 in type 2 diabetic patients with different levels of albuminuria. *Eur J Clin Invest*,2011,41:589-596.