

# 筋骨草总黄酮治疗系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 变化的实验研究

彭卫华 南丽红 赖文芳 贾铷 吴符火 徐曾涛

**【摘要】 目的** 探讨筋骨草总黄酮(TFA)治疗系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)大鼠后核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)及下游转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)的变化。**方法** 采用改良慢性血清病 MsPGN 大鼠模型,于造模第5周末检测尿蛋白,将尿蛋白阳性者随机分为模型组、雷公藤多甙(TWP)组、不同剂量 TFA 组。于造模第6周开始给药,6周后,测定各组大鼠的24h尿蛋白定量、血生化和肾组织病理变化,MaxVision™即用型快速免疫组化一步法检测大鼠肾组织中NF- $\kappa$ B p65的表达,双抗体夹心法检测血清中TGF- $\beta$ 1的变化。**结果** TFA可显著降低尿蛋白,明显减小系膜区面积占毛细血管丛面积的百分比( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );高、中剂量的TFA治疗效果与TWP相近( $P>0.05$ )。模型对照组大鼠肾组织NF- $\kappa$ B p65、血清TGF- $\beta$ 1的表达明显高于正常对照组[NF- $\kappa$ B p65:  $28.93 \pm 4.45$  vs.  $4.51 \pm 0.96$ ,  $P<0.01$ ; TGF- $\beta$ 1: ( $247.63 \pm 51.55$ ) pg/ml vs. ( $127.52 \pm 27.84$ ) pg/ml,  $P<0.01$ ];干预性治疗后,TFA高、中剂量组、TWP组大鼠血清中NF- $\kappa$ B p65、TGF- $\beta$ 1的表达[NF- $\kappa$ B p65:  $10.35 \pm 2.81$ ,  $15.21 \pm 4.71$ ,  $11.70 \pm 3.97$ ,  $P<0.01$ ; TGF- $\beta$ 1: ( $181.96 \pm 52.93$ ) pg/ml, ( $204.33 \pm 38.30$ ) pg/ml, ( $188.07 \pm 42.92$ ) pg/ml,  $P<0.05$ ]较模型对照组明显降低。**结论** TFA降低NF- $\kappa$ B并进而降低TGF- $\beta$ 1可能是治疗MsPGN大鼠的作用机制之一。

**【关键词】** 筋骨草属; 肾小球肾炎,膜增生性; NF- $\kappa$ B; 转化生长因子 $\beta$ 1

**Experimental effects study of total flavonoids of Ajuga on nuclear transcriptional factor of kappa B in mesangial proliferative glomerulonephritis rats** PENG Wei-hua\*, NAN Li-hong, LAI Wen-fang, JIA Ru, WU Fu-huo, XU Zeng-tao. \*Department of Nephrology, Fuzhou General Hospital, Nanjing Command PLA, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: NAN Li-hong, Email: 847593275@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of total flavonoids of Ajuga (TFA) on nuclear transcriptional factor of kappa B (NF- $\kappa$ B) in mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN) rats. **Methods** MsPGN rat was induced by the improved chronic serum sickness model after five weeks. the positive urinary protein rats were randomly divided into model group, tripterygium wilfordii polyglycosidum (TWP) group and TFA group with different dosage, normal rats was considered as the control group. MsPGN rats were treated with drugs since the sixth week; succeeding six weeks later, all rats were detected 24 h urinary protein, blood biochemistry, NF- $\kappa$ B change in renal tissue by immunohistochemical method, serum transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) was measured by double antibody sandwich ELISA immunoassay. **Results** Compared with model group, TFA can significantly reduce the urinary protein, decrease BUN, Scr, TG, TC, mitigate the morphological damage ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); The effects of high-dosage (2.160 g/kg) TFA and middle-dosage (1.080 g/kg) TFA were as similar as those of TWP ( $P>0.05$ ). The renal tissue NF- $\kappa$ B (Integral optical density, IOD) and serum TGF- $\beta$ 1 (pg/ml) in model control was significantly higher than that in normal control group, NF- $\kappa$ B p65  $28.93 \pm 4.45$  vs.  $4.51 \pm 0.96$ ,  $P<0.01$ ; TGF- $\beta$ 1: ( $247.63 \pm 51.55$ )pg/ml vs. ( $127.52 \pm 27.84$ )pg/ml,  $P<0.01$ ; With the intervention therapy of high-dosage TFA, middle-dosage TFA and TWP, the expression of NF- $\kappa$ B in renal tissue and TGF- $\beta$ 1 in serum was significantly decreased compared with model control group, NF- $\kappa$ B p65:  $10.35 \pm 2.81$ ,  $15.21 \pm 4.71$ ,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.083

基金项目:福建省卫生厅中医药科研重点课题(wzzsb0906);陈可冀中西医结合发展基金·福建省中西医结合老年性疾病重点实验室开放课题资助项目(CKJ2008088);福建中医药大学校级课题(X2009069)

作者单位:350025 福州,南京军区福州总医院肾脏科 厦门大学附属东方医院 福建医科大学、福建中医药大学、安徽医科大学福总临床医学院(彭卫华);福建中医药大学药学院(南丽红、赖文芳、贾铷、吴符火、徐曾涛)

通讯作者:南丽红, Email: 847593275@qq.com

11.70±3.97,  $P < 0.01$ ; TGF- $\beta$ 1: (181.96±52.93)pg/ml, (204.33±38.30)pg/ml, (188.07±42.92)pg/ml,  $P < 0.05$ .

**Conclusion** Reducing the expression of NF- $\kappa$ B and successive TGF- $\beta$ 1 may be one of the mechanisms of total flavonoids of *Ajuga* treatment on MsPGN rats.

**【Key words】** *Ajuga*; Glomerulonephritis, membranoproliferative; NF-kappa B; Transforming growth factor beta1

核转录因子- $\kappa$ B (nuclear transcriptional factor of kappa B, NF- $\kappa$ B) 是转录因子家族的重要成员, 参与转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta$ 1) 等炎性反应细胞因子和趋化因子的产生、成纤维细胞的增生分化、细胞外基质交联及细胞凋亡等过程<sup>[1]</sup>, 在一些肾脏疾病发生、发展过程中的作用不容忽视, 特别是致炎性及致纤维化作用。抗氧化剂维生素 E 和 C、抗炎性反应药物糖皮质激素、血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 类药物等可通过抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 减低 NF- $\kappa$ B 活性, 减轻炎性反应引起的肾脏损伤。筋骨草 (*Ajuga decumbens* Thunb) 为福建各地常见的一种一年生或多年生野生草本, 属唇形科植物, 具有清热抗炎、抑制 I 型变态反应等作用, 研究发现其有效成分木犀草素即为黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。本文课题组前期研究发现筋骨草总黄酮 (total flavonoids of *Ajuga*, TFA) 对系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 具有治疗作用<sup>[3-6]</sup>, 能有效降低蛋白尿、保护肾功能, 其具体作用机制有待进一步探明。本文拟从 TFA 对 MsPGN 大鼠 NF- $\kappa$ B 的干预作用作一研究。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 实验药物中 TFA 的制备: 同文献<sup>[3]</sup>, 制得每 1 ml 含黄酮 0.54 g, 相当于生药 3 g。雷公藤多甙 (tripterigium wilfordii polyglycosidium, TWP) 片, 批号: Z43020158, 浙江普洛康裕天然药物有限公司产品。

2. 实验动物: 选择 SD 雄性大鼠, 6~8 周龄, 体重 (200±20) g。由福建中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK 沪 2007-0005。适应性喂养 1 周, 经检测尿蛋白为阴性者进入实验。

3. 主要试剂和仪器: 完全福氏佐剂, SIGMA 公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA), 罗氏公司产品; NF- $\kappa$ B p65 Mouse Monoclonal IgG, 北京中杉金桥生物技术有限公司提供, 批号 SC-8008; TGF- $\beta$ 1 ELISA 试剂盒, 上海森雄科技实业有限公司, 批号为 0810121; MaxVision™ 试剂盒 (KIT-5001 MaxVision™ HRP-Polymer anti-Mouse IHC Kir), 福州迈新生物技术开发有限公司, 批号 090908408D; 7230G 型紫外可见分光光度计 (上海), Olympus AU640 型全自动生

化仪 (日本), Motic Images Advanced 3.2 图像采集分析系统 (麦克奥迪实业集团有限公司), DMBA400 型数码生物显微系统 (美国)。

### 二、实验方法

1. MsPGN 模型的制备及分组: 参照文献<sup>[7]</sup>, 随机按体重选取 10 只大鼠作为正常对照组, 其余大鼠腹腔麻醉消毒后, 背侧切除左侧肾脏, 休养 1 周。实验鼠经预免疫后每日腹腔注射 BSA 免疫: 剂量从每只 1 mg 开始, 每日增加 1 mg, 至 5 mg 为止, 继续每周加量 1 mg, 至 10 mg 为止。存活大鼠于造模第 5 周末, 进行尿蛋白检测。因麻醉意外和手术后出血死亡 3 只, 预免疫 1 周内 2 只死于超敏反应, 剔除 4 只尿蛋白阴性者, 共 49 只出现明显蛋白尿大鼠按体重随机分为以下各组: 模型对照组、TWP 组、TFA 高剂量 (2.160 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 组、TFA 中剂量 (1.080 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 组、TFA 低剂量 (0.540 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 组 (除 TFA 高剂量组 9 只外其余各组 10 只, 表 1), 各组尿蛋白定量匹配、无统计学差异。

2. 给药方法: 造模第 6 周开始给药, 按 1 ml/100 g 灌胃, 每日 1 次, 连续 6 周。经预试验后 TFA 组按以上高、中、低不同剂量给药, TWP 组按 0.018 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 给药, 药量为成人每日每千克体重用量的 12 倍; MsPGN 各组灌服等量容积的液体, 正常对照组不予处理。

3. 测定指标: 于给药第 6 周末留取大鼠 24 h 尿液, 考马斯亮蓝法检测 24 h 蛋白尿定量, 次日心脏取血常规检测生化 [总蛋白 (TP)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、尿素氮 (BUN)、血肌酐 (Scr) 等] 及血清 TGF- $\beta$ 1 检测。

血清 TGF- $\beta$ 1 检测: 原理采用双抗体夹心酶标免疫分析法, 用抗大鼠 TGF- $\beta$ 1 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 TGF- $\beta$ 1 与单抗结合, 加入生物素化的抗大鼠 TGF- $\beta$ 1 抗体, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的链霉亲和素 (Streptavidin) 与生物素结合, 加入酶底物邻苯二胺 (OPD), 出现黄色, 加终止液浓硫酸, 颜色变深, 在 492 nm 处测 OD 值, TGF- $\beta$ 1 浓度与 OD 值成正比, 通过绘制标准曲线求出标本中 TGF- $\beta$ 1 浓度, 具体如下: 已包被抗体的 96 孔反应板, 设立标准孔 8 孔, 每孔中先各加入样品稀释液 100  $\mu$ l, 第一孔

再加标准品 100  $\mu\text{l}$ , 混匀后吸出 100  $\mu\text{l}$ , 移至第二孔, 如此反复作对倍稀释至第 7 孔, 吸出 100  $\mu\text{l}$  弃去, 每孔均为 100  $\mu\text{l}$ 。第 8 孔为空白对照。待测样品孔中每孔各加入待测样品 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  120 min; 洗涤后每孔加入第一抗体工作液 50  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  6 min; 洗涤后每孔加酶标抗体工作液 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  60 min; 洗涤后每孔加入底物工作液 100  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  暗处 5 min, 每孔加入 50  $\mu\text{l}$  终止液混匀。用酶标仪在 492 nm 处测吸光值。以标准品浓度 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/ml 为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线; 根据标准曲线计算待测样品中 TGF- $\beta$ 1 含量。

4. 肾组织标本制作及肾组织 NF- $\kappa$ B p65 检测: 留取上述标本后处死大鼠, 取右侧肾脏, 10% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, HE、PASM 染色, 显微镜下观察拍照, Motic Images Advanced 3.2 图像分析软件对 PASM 染色的肾组织进行半定量分析。在上、下、左、右、中视野每份样本各取肾小球 2 个(共 10 个), 检测毛细血管丛面积、系膜区面积, 并计算系膜区面积与整个毛细血管丛面积的百分比。

免疫组化法检测大鼠肾组织中 NF- $\kappa$ B p65 的表达采用 MaxVision<sup>TM</sup> 即用型快速免疫组化一步法试剂盒检测, 具体如下: 石蜡切片常规脱蜡和水化后浸入盛有 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0), 加热 1.5 min 修复抗原, 自然冷却后 0.01 mol/L PBS 液洗涤, 50  $\mu\text{l}$  3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下孵育 10 min, PBS 液洗涤, 每片加 50  $\mu\text{l}$  非免疫山羊血清, 室温下 10 min, 甩去血清; 滴加 50  $\mu\text{l}$  NF- $\kappa$ B p65 (一抗稀释浓度为 1:100), 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h; PBS 冲洗; 每片加 50  $\mu\text{l}$  即用型 MaxVision<sup>TM</sup> 试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min。PBS 冲洗; 显色剂显色: 每张切片加 100  $\mu\text{l}$  新鲜配制的 AEC 显色液, 阳性染色为棕黄色, 背景清晰为宜。实验中以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

免疫组化染色阳性结果的判定标准是阳性组织呈棕黄色, 分布于肾小球系膜细胞的细胞质、胞核、核膜及肾小管上皮细胞的细胞质等部位, 阴性部分呈淡蓝色。每张切片在 400 倍光镜下随机选取 10 个肾小球, 采用 Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统软件进行图像分析, 取其平均值作为该切片的积分光密度值(integrated optical density, IOD)。积分光密度值是平均光密度和面积的乘积, 可以全面反映蛋白表达量。

### 三、统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学处理, 所有结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间两两比较用  $q$  检验。相关分析采用 Spearman 等级相关分析法。定  $\alpha=0.05$  为检验标准,  $P<0.05$  有统计学意义。

## 结 果

1. TFA 对 MsPGN 大鼠的治疗作用(表 1, 2): 模型对照组尿蛋白(mg/24 h)显著高于正常对照组(38.91  $\pm$  10.62 vs. 9.96  $\pm$  4.38,  $P<0.01$ ), 且较第 5 周末尿蛋白明显增加(38.91  $\pm$  10.62 vs. 28.87  $\pm$  5.64,  $P<0.05$ ); 而 TWP 组、TFA 高、中、低剂量组治疗后尿蛋白均明显降低( $P<0.05$ ), 且 TWP 组、TFA 高、中剂量组与模型组尿蛋白相比显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。TFA 各剂量组、TWP 组血清 TP 与模型对照组相比明显升高( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ), 模型对照组血清 TG、TC、BUN、Scr 明显高于正常对照组( $P<0.01$ ), 而 TFA 高、中剂量组、TWP 组血清 TG、BUN、Scr 则明显降低( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ), 且 TFA 高剂量组降低 TG 的作用优于 TWP ( $P<0.05$ ); TFA 高、中剂量组血清 TC 明显低于模型对照组、TWP 组( $P<0.05$ )。TWP 组 ALT 显著高于正常对照组、模型对照组、TFA 各剂量组( $P<0.01$ ), 模型对照组、TFA 各剂量组 ALT 与正常对照组相比无统计学差异( $P>0.05$ ), 提示 TFA 治疗过程中无明显肝损害。

2. TFA 对 MsPGN 大鼠肾脏组织改变的影响: 模型大鼠肾小球病理改变符合 MsPGN 表现: 模型对照组中增生的肾小球系膜细胞(GMC)与系膜基质压迫毛细血管腔, 并有广泛的毛细血管内皮细胞肿胀, 系膜区面积占毛细血管丛面积的百分比明显大于正常对照组(0.304  $\pm$  0.059 vs. 0.140  $\pm$  0.026,  $P<0.01$ )。TFA 干预治疗后, TFA 各剂量组系膜区面积占毛细血管丛面积的百分比明显减小(0.166  $\pm$  0.030, 0.179  $\pm$  0.056, 0.196  $\pm$  0.035, 0.258  $\pm$  0.058,  $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 见表 3。

3. TFA 对 MsPGN 大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响(图 1~7): 肾小球中 NF- $\kappa$ B p65 在细胞质和细胞核中均有表达。正常组大鼠的肾小球中 NF- $\kappa$ B p65 只有极少活化或表达(图 1)。模型组大鼠肾小球 NF- $\kappa$ B p65 表达明显增多(NF- $\kappa$ B p65: 28.93  $\pm$  4.45 vs. 4.51  $\pm$  0.96,  $P<0.01$ ), 且棕色颗粒大部分已进入细胞核(图 2); TFA、TWP 组治疗组大鼠肾小球 NF- $\kappa$ B p65 的阳性表达主要集中在胞质, 虽比正常对照组高, 但较模型对照组明显减少(10.35  $\pm$  2.81, 15.21  $\pm$  4.71, 11.70  $\pm$  3.97, 23.45  $\pm$  4.22,  $P<0.05$  或  $P<0.01$ ) (图 3~6)。TFA 高、中剂量组大鼠肾小球 NF- $\kappa$ B p65 的表达与 TWP 组相比无明显差异性, 但低剂量组的表达明显多于 TWP 组( $P<0.01$ ) (表 3 和图 3~6)。

4. TFA 对 MsPGN 大鼠 TGF- $\beta$ 1 的影响: 模型对照组大鼠血清中 TGF- $\beta$ 1 表达明显高于正常对照组

表1 TFA 治疗后大鼠尿蛋白及生化指标的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	剂量(g · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> )	尿蛋白(mg/24h)		TP (g/L)	ALT (U/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
			造模第5周末	给药第6周末				
正常对照组	10	—	6.65±2.17	9.96±4.38	76.40±8.30	51.10±9.21	1.61±0.37	1.56±0.28
模型对照组	10	—	28.87±5.64 <sup>b</sup>	38.91±10.62 <sup>bc</sup>	51.90±7.32 <sup>b</sup>	58.50±11.03	2.39±0.47 <sup>b</sup>	2.41±0.79 <sup>b</sup>
TWP组	10	0.018	26.30±7.32 <sup>b</sup>	17.53±7.37 <sup>ace</sup>	65.10±15.30 <sup>d</sup>	83.40±11.53 <sup>bc</sup>	1.98±0.40 <sup>ad</sup>	1.95±0.37 <sup>a</sup>
TFA高剂量组	9	2.160	28.64±5.73 <sup>b</sup>	21.64±6.59 <sup>bce</sup>	71.67±12.41 <sup>e</sup>	50.78±6.78 <sup>e</sup>	1.65±0.27 <sup>ef</sup>	1.59±0.31 <sup>df</sup>
TFA中剂量组	10	1.080	27.12±4.89 <sup>b</sup>	18.28±8.07 <sup>ace</sup>	68.33±14.05 <sup>e</sup>	57.60±8.09 <sup>e</sup>	1.94±0.38 <sup>d</sup>	1.63±0.23 <sup>df</sup>
TFA低剂量组	10	0.540	26.12±4.52 <sup>b</sup>	30.01±7.55 <sup>bdg</sup>	60.80±10.88 <sup>bd</sup>	52.20±8.60 <sup>e</sup>	2.41±0.46 <sup>b</sup>	2.18±0.65 <sup>a</sup>

注:与正常对照组相比, <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01;与给药前相比, <sup>c</sup>P<0.05;与模型对照组相比, <sup>d</sup>P<0.05, <sup>e</sup>P<0.01;与TWP组相比, <sup>f</sup>P<0.05, <sup>g</sup>P<0.01

表2 TFA 治疗后大鼠尿蛋白及生化指标的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	剂量(g · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> )	尿蛋白(mg/24h)		BUN (mmol/L)	Scr (μmol/L)
			造模第5周末	给药第6周末		
正常对照组	10	—	6.65±2.17	9.96±4.38	9.44±1.97	40.50±10.29
模型对照组	10	—	28.87±5.64 <sup>b</sup>	38.91±10.62 <sup>bc</sup>	15.76±3.57 <sup>b</sup>	63.20±16.78 <sup>b</sup>
TWP组	10	0.018	26.30±7.32 <sup>b</sup>	17.53±7.37 <sup>ace</sup>	11.17±2.74 <sup>ac</sup>	45.62±9.86 <sup>d</sup>
TFA高剂量组	9	2.160	28.64±5.73 <sup>b</sup>	21.64±6.59 <sup>bce</sup>	11.62±1.78 <sup>ac</sup>	48.67±6.80 <sup>d</sup>
TFA中剂量组	10	1.080	27.12±4.89 <sup>b</sup>	18.28±8.07 <sup>ace</sup>	12.56±2.85 <sup>ad</sup>	50.10±7.30 <sup>ad</sup>
TFA低剂量组	10	0.540	26.12±4.52 <sup>b</sup>	30.01±7.55 <sup>bdg</sup>	13.37±4.01 <sup>a</sup>	58.80±9.26 <sup>bf</sup>

注:与正常对照组相比, <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01;与给药前相比, <sup>c</sup>P<0.05;与模型对照组相比, <sup>d</sup>P<0.05, <sup>e</sup>P<0.01;与TWP组相比, <sup>f</sup>P<0.05, <sup>g</sup>P<0.01

表3 TFA 对 MsPGN 大鼠血清中肾脏病理学改变、肾组织 NF-κB p65、血清 TGF-β1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	剂量(g · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> )	系膜区面积/毛细血管丛面积	NF-κB p65	TGF-β1(pg/ml)
正常对照组	10	—	0.140±0.026	4.51±0.96	127.52±27.84
模型对照组	10	—	0.304±0.059 <sup>b</sup>	28.93±4.45 <sup>b</sup>	247.63±51.55 <sup>b</sup>
TWP组	10	0.018	0.166±0.030 <sup>d</sup>	11.70±3.97 <sup>bd</sup>	188.07±42.92 <sup>ac</sup>
TFA高剂量组	9	2.160	0.179±0.056 <sup>d</sup>	10.35±2.81 <sup>bd</sup>	181.96±52.93 <sup>ac</sup>
TFA中剂量组	10	1.080	0.196±0.035 <sup>ad</sup>	15.21±4.71 <sup>bd</sup>	204.33±38.30 <sup>bc</sup>
TFA低剂量组	10	0.540	0.258±0.058 <sup>bce</sup>	23.45±4.22 <sup>bef</sup>	216.69±44.48 <sup>b</sup>

注:与正常对照组相比, <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01;与模型对照组相比, <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01;与TWP组相比, <sup>e</sup>P<0.05, <sup>f</sup>P<0.01

[ (247.63±51.55) pg/ml vs. (127.52±27.84) pg/ml, P<0.01]; 干预性治疗后, TFA 高、中剂量、TWP 组大鼠血清中 TGF-β1 [ (181.96±52.93) pg/ml, (204.33±38.30) pg/ml, (188.07±42.92) pg/ml ] 的表达明显低于模型组 (P<0.05); TFA 高、中剂量组大鼠血清中 TGF-β1 的表达与 TWP 组无明显差异性 (P>0.05); TFA 低剂量组虽较模型对照组有所降低, 但无统计学意义 (P>0.05), 见表 3。

5. 相关性分析: NF-κB p65 与 TGF-β1 进行相关性分析, r=0.598, P<0.05, 呈显著正相关。

### 讨 论

NF-κB 即 p50/p65 二聚体是转录因子家族的重要成员, 细胞静息状态时, NF-κB 在胞质内与其抑制蛋白 IκBα 形成无活性的三聚体, 在外界因素如脂多糖 (LPS)、IL-1、TNF-α 等的刺激下, IκB 从三聚体中解

离下来, 暴露 p50 亚基的核定位序列及 p65 亚基的 DNA 结合位点, 促使 NF-κB 由胞质移位至胞核, p65 在蛋白的 C 末端含有转录激活区域, 在核内与多种基因启动子特异性序列结合, 尤其是调控免疫炎症反应相关的基因, 如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α、TGF-β 等, 调节这些基因的转录活性, 发挥其重要的生物学作用, 如参与免疫反应、淋巴细胞分化、生长控制、细胞内信号传递, 调控多种基因的表达等<sup>[1]</sup>。因此通过检测 NF-κB 的主要亚基 p65 是否被转移到细胞核内, 就可以判断 NF-κB 是否被激活。本实验结果显示, 正常肾组织肾小球内存在有少量的 NF-κB p65 的活化, 表明 NF-κB p65 在参与肾小球正常的新陈代谢及其生理功能中具有一定的作用。与正常对照组相比, MsPGN 模型大鼠肾组织中 NF-κB p65 表达明显增加 (表 2, 图 2) (P<0.01), 阳性部位主要集中在肾小球, 且阳性棕黄色颗粒大部分已进入细胞核, 提示在 MsPGN 大鼠肾

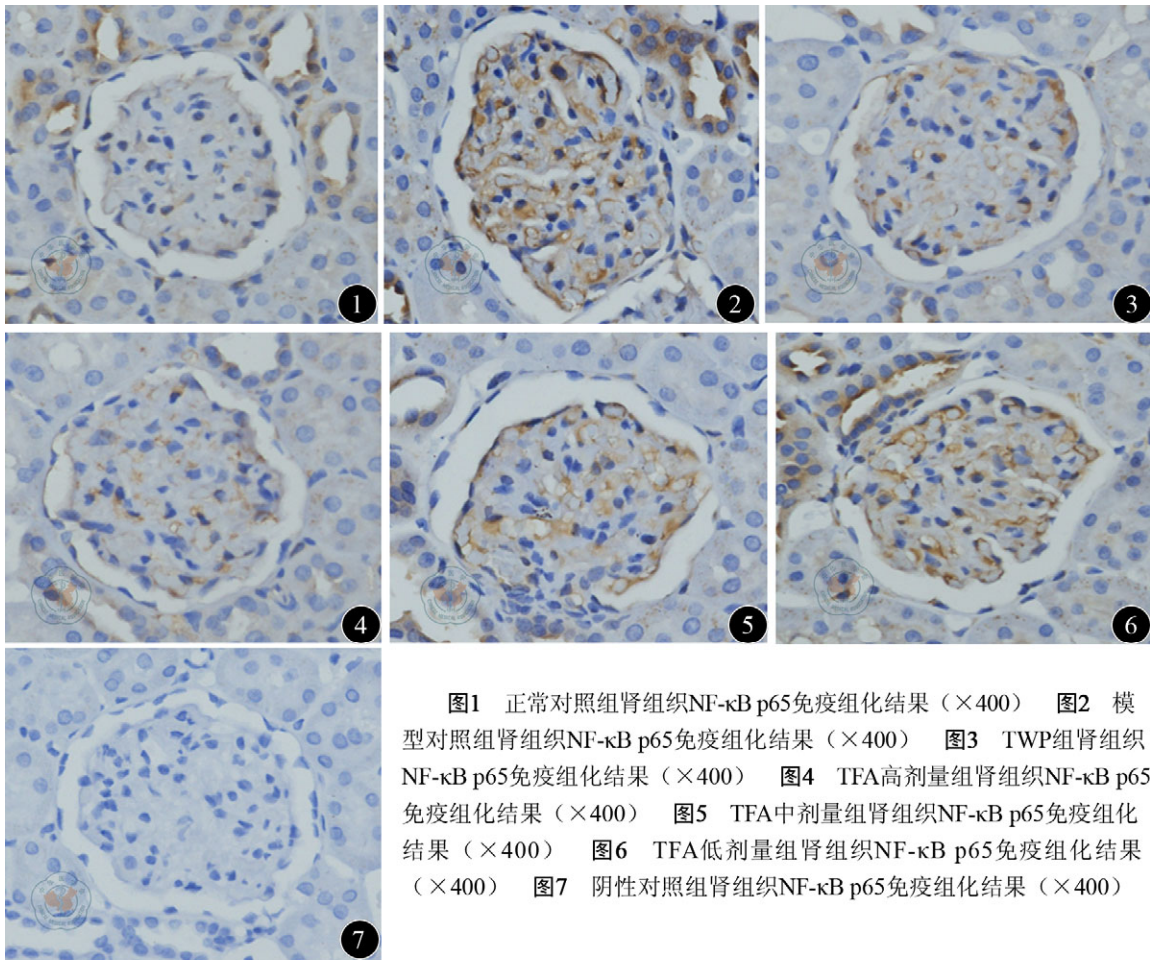


图1 正常对照组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400) 图2 模型对照组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400) 图3 TWP组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400) 图4 TFA高剂量组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400) 图5 TFA中剂量组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400) 图6 TFA低剂量组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400) 图7 阴性对照组肾组织NF-κB p65免疫组化结果(×400)

组织中 NF-κBp65 的活性明显增高,核转位明显增加。研究证实多种肾炎患者的肾脏中 NF-κB 均有激活<sup>[8-11]</sup>。NF-κB 活化可刺激系膜增生,并对系膜细胞分泌的多种细胞因子起调控作用<sup>[8]</sup>。由 NF-κB 调控表达的免疫炎症蛋白和信号分子可增加滤过膜通透性,产生蛋白尿,赵红洋等<sup>[9]</sup>发现 MsPGN 患儿肾组织 NF-κB 活化水平随系膜增殖程度加重而增高,原发性肾病综合征患儿肾小球及肾小管 NF-κB 表达水平与 24 h 尿蛋白定量呈显著正相关。在 IgA 肾病患者的系膜增生、小管萎缩及炎性细胞浸润处均发现 NF-κB 活性异常增高,导致 MCP-1、GM-CSF、ICAM-1 转录增加<sup>[10]</sup>。NF-κB 激活后可促进纤维化细胞因子 TGF-β、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 等的表达及成纤维细胞的增生、分化,引起组织纤维化;TGF-β1 能够增加细胞外基质合成,减少细胞外基质分解及增加并协调整合素的表达,促使细胞外基质在肾脏过度积聚,最终导致肾小球硬化。鱼油含有 EPA 和 DHA 通过 PPAR2γ 途径可以抑制 NF-κB 活性,从而延缓肾脏疾病尤其是 IgA 肾病的进展<sup>[11]</sup>。抗氧化剂维生素 E 和 C、抗炎性反应药物糖皮质激素<sup>[8]</sup>、ACEI 类药物等也可通过抑制 NF-κB 活化,

减低 NF-κB 活性,减轻炎症反应引起的肾脏损伤。

MsPGN 是临床导致肾衰竭的最主要原因之一,中医药独特治疗在延缓肾小球进行性损伤的进程方面有一定优势。本研究应用高、中剂量的 TFA 治疗 MsPGN 模型大鼠后,可显著降低模型大鼠的尿蛋白、血 BUN、Scr,明显减少系膜区面积占毛细血管丛面积的百分比、减轻肾脏损害,升高血中 TP 水平,明显降低血清 TGF-β1 的表达(表 2)( $P < 0.05$ ),说明 TFA 在降低 MsPGN 尿蛋白、保护肾功能等方面具有治疗作用<sup>[3-6]</sup>。对肾组织进行 NF-κB p65 检测发现,与模型组比较,TFA 治疗组大鼠肾组织中 NF-κB p65 的表达明显降低(表 2,图 4~6)( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),肾小球部位的阳性颗粒主要集中在胞质,细胞核着色明显变浅,提示 TFA 可明显抑制 NF-κB p65 亚单位的活化与核移位,有利于阻止 NF-κB 与 DNA 的结合,NF-κB p65 与 TGF-β1 呈显著正相关性( $r = 0.598, P < 0.05$ ),提示 TFA 继而阻断了 NF-κB 的信号转导,减弱其下游基因的生物效应,从而达到治疗 MsPGN 的作用。

参 考 文 献

[1] Chen F, Castranova V, Shi X, et al. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of



- diseases. Clin Chem, 1999, 45: 7-17.
- [2] 金继曙, 都述虎. 筋骨草中黄酮类成分的研究. 安徽医学, 1994, 15: 51-52.
- [3] 南丽红, 彭卫华, 郑省兰, 等. 筋骨草总黄酮对慢性血清病肾炎大鼠自由基损伤的影响. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10: 867-870.
- [4] 南丽红, 彭卫华, 方泰惠, 等. 筋骨草黄酮类提取物治疗系膜增生性肾炎大鼠的实验研究. 中国中医急症, 2009, 18: 1849-1851.
- [5] 南丽红, 彭卫华, 方泰惠, 等. 筋骨草对改良慢性血清病系膜增生性肾小球肾炎大鼠的影响. 中华中医药学刊, 2009, 27: 2366-2368.
- [6] 南丽红, 彭卫华, 贾铷, 等. 筋骨草总黄酮对 MsPGN 大鼠血清 IL-1、TNF- $\alpha$  水平的影响. 中华中医药学刊, 2013, 31: 1627-1630.
- [7] 贾慧, 邹万忠. 改良慢性血清病性大鼠系膜增生性肾炎模型的建立. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1996, 5: 21-25.
- [8] Auwardt RB, Mudge ST, Chen CG, et al. Regulation of nuclear factor kappaB by corticosteroids in rat mesangial cells. J Am Soc Nephrol, 1998, 9: 1620-1628.
- [9] 赵红洋, 孙若鹏, 甄军晖, 等. 原发性肾病综合征患儿肾组织核因子-kB 活化水平与病理类型及尿蛋白关系. 中国实用儿科杂志, 2005, 20: 340.
- [10] Kaimori JY, Takenaka M, Nagasawa Y, et al. Quantitative analyses of osteopontin mRNA expression in human proximal tubules isolated from renal biopsy tissue sections of minimal change nephrotic syndrome and IgA glomerulonephropathy patients. Am J Kidney Dis, 2002, 39: 948-957.
- [11] Li H, Ruan XZ, Powis SH, et al. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. Kidney Int, 2005, 67: 867-874.

(收稿日期: 2013-10-31)

(本文编辑: 戚红丹)

彭卫华, 南丽红, 赖文芳, 等. 筋骨草总黄酮治疗系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 变化的实验研究 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (23): 10752-10757.