

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.02.007

木犀草素对单侧输尿管梗阻模型大鼠肾脏的抗炎及抗纤维化作用

汪海洋¹, 陈宇诗¹, 金大春¹, 张金栋¹, 刘颖菊², 杜永洪^{1△}

(1. 重庆医科大学生物医学工程学院/省部共建国家重点实验室培育基地—重庆市超声医学工程重点实验室/重庆市生物医学工程学重点实验室 400016; 2. 重庆医科大学药学院 400016)

[摘要] **目的** 观察木犀草素对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏炎症反应和纤维化的影响及对梗阻性肾病的治疗作用。**方法** 将雄性 SD 大鼠 32 只按照随机数字表分组方法分为假手术组(Sham 组, $n=8$)、模型组(模型组, $n=8$)、地塞米松组($n=8$)和木犀草素组($n=8$)。Sham 组行左侧输尿管分离术, 后 3 组行左侧输尿管结扎术。术后第 1 天按照要求开始给药, 各组大鼠于手术后 10 d 眶静脉取血并留取梗阻侧肾组织后处死, 比色法检测血清尿素氮、肌酐的变化, HE 和 Masson 染色观察肾组织病理变化, 并用间质损伤指数和肾小管间质纤维化积分定量观察肾组织损伤情况。**结果** 与 Sham 组对比, 模型组大鼠肾脏明显肿大、皮质明显变薄、肾小管变形明显、炎症反应明显, 间质损伤指数、纤维化积分明显增加($P<0.05$), 尿素氮、血肌酐明显增加($P<0.05$); 木犀草素组和地塞米松组大鼠肾脏肿大、皮质变薄、肾小管变形、轻度炎症反应, 两组间质损伤指数、纤维化积分明显增加($P<0.05$), 木犀草素组尿素氮、血肌酐明显增加($P<0.05$), 地塞米松组尿素氮、血肌酐变化不明显。与模型组对比, 木犀草素组和地塞米松组肾脏体积明显变小、皮质变薄程度较小、肾小管变形减轻、炎症反应明显减弱, 间质损伤指数、纤维化积分明显降低($P<0.05$), 尿素氮、血肌酐明显降低($P<0.05$), 木犀草素组和地塞米松组两组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 木犀草素不能完全阻止或逆转单侧输尿管梗阻大鼠肾脏的组织结构损伤和功能改变, 但是其能够减轻单侧输尿管梗阻大鼠肾脏的炎症反应、肾功能损害及病理损害, 效果较地塞米松有一定的差异。

[关键词] 木犀草素; 地塞米松; 输尿管梗阻; 炎症; 纤维化**[中图分类号]** R692**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)02-0167-04**Effects of luteolin on anti-inflammatory and anti-fibrosis of kidney in rats with unilateral ureter obstruction**Wang Haiyang¹, Chen Yushi¹, Jin Dachun¹, Zhang Jindong¹, Liu Yingju², Du Yonghong^{1△}

(1. Biomedical Engineering College of Chongqing Medical University/State Key Laboratory of Medical Ultrasound Engineering Co-founded by Chongqing Municipality and Ministry of Science and Technology/Key Laboratory of Biomedical Engineering of Chongqing City, Chongqing 400016, China; 2. School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether luteolin ease anti-inflammatory and anti-fibrosis of unilateral ureter obstruction of kidney in rats and its therapeutic effect on obstructive nephropathy. **Methods** Thirty two SD rats were randomly assigned into four groups as follows: sham operation group($n=8$), model group($n=8$), dexamethasone group($n=8$) and luteolin group($n=8$). The sham group were exposed to left ureter separation operation, while the other three groups were treated with left ureter ligation operation. Then four groups received drug as the operation demanded. Rats were sacrificed at the 10th day after we had got the blood and collected obstructed lateral kidney. Then colorimetric determination was taken to test the changes of serum nitrogen and serum creatinine, and the kidney tissue were stained with HE and Masson to assess histology pathological changes. We also assess the severity of renal interstitium by using the index of intestinal damage and fibrosis. **Results** Compared with sham group, we could observe several changes in model group as follows: the obvious enlargement of the kidney, cortex thinning, the deformation of renal tubular, and the evident inflammatory reaction, as well as the significant increase of the index of intestinal damage and fibrosis integral of renal interstitium increased($P<0.05$), serum nitrogen and creatinine ($P<0.05$). Similar to model group, such changes were observed in the luteolin group and dexamethasone group; rats' kidney were enlarged, inflammatory reaction, the index of intestinal damage and fibrosis integral of renal interstitium decreased significantly($P<0.05$), the luteolin group serum nitrogen and creatinine increased significantly ($P<0.05$), yet that in the dexamethasone group was not significant; contrasted with model group, whereas, luteolin group and dexamethasone group kidneys', volume diminished distinctly, but much bigger than those in sham group, cortex thinning was less obvious, the inflammatory reaction weakened distinctly, as well as the renal tubular decoration and the index of intestinal damage. Fibrosis integral of renal interstitium decreased significantly($P<0.05$), the serum nitrogen and creatinine decreased significantly ($P<0.05$), there was remarkable difference between the dexamethasone group and the luteolin group($P<0.05$). **Conclusion** Luteolin can't completely prevent or reverse unilateral ureter obstruction rat kidney tissue damaging and functional changing, but it can ease the unilateral ureter obstruction rats inflammatory reaction, kidney destruction as well as renal pathological damaging. Its therapeutic effect is inferior than that of dexamethasone.

[Key words] luteolin; dexamethasone; ureteral obstruction; inflammation reaction; fibrosis

肾小管间质性肾炎是由多种病因引起的以肾小管间质炎症损伤为主的一组疾病,是引起肾衰竭的重要疾病,肾脏间质纤维化是本病发展到终末期肾病的病理特征。木犀草素(luteolin)属于黄酮类化合物,主要存在于菊花、忍冬花、紫苏叶等天然药物中,具有多种药理特性,如抗氧化、抗炎、免疫调节等^[1-3]。本研究拟采用大鼠单侧输尿管结扎诱导的单侧输尿管梗阻模型^[4],探讨木犀草素对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏炎症反应和间质纤维化的影响及对梗阻性肾病的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料 总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒、尿素氮试剂盒、肌酐试剂盒(南京建成生物工程研究所);木犀草素(西安玉泉生物科技有限公司),以 0.5% 的二甲基亚砷溶液为溶剂配成 60 mg/mL 木犀草素溶液^[5];地塞米松(Sigma 公司),以 0.5% 二甲基亚砷溶液为溶剂配成 10 mg/mL 地塞米松溶液。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与单侧输尿管梗阻模型建立 8 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 32 只,由重庆医科大学动物实验中心提供,体质量(180±20)g。参照随机数字表分组方法分成假手术组(Sham 组)、模型组、木犀草素组、地塞米松组,每组 8 只。模型组、木犀草素组、地塞米松组参照文献^[4]建立 UUO 模型,大鼠用戊巴比妥钠(质量分数为 3%)腹腔注射麻醉后,腹部正中偏左纵切口 1.5 cm 打开腹腔,暴露左肾,钝性分离左侧输尿管,于输尿管中段处行左侧输尿管结扎后缝合腹腔;Sham 组打开腹腔后仅分离左侧输尿管不结扎。造模后第 1 天开始给药,Sham 组和模型组按照 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量腹腔注射生理盐水,木犀草素组按照 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量腹腔注射 60 mg/mL 木犀草素溶液,地塞米松组按照 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量腹腔注射 10 mg/mL 地塞米松溶液,连续给药 10 d。

1.2.2 标本处理 各组大鼠于术后 10 d 采用眶静脉取血方法取血 1.5 mL,并迅速采用离心机分离得到血清(1 500 r/min 离心 5 min),比色法测定尿素氮、肌酐。取血后迅速处死,取出梗阻侧肾组织,称其质量,然后纵行剖开分成两份,用生理盐水冲洗后一部分置于 10% 甲醛固定液中,另一部分迅速置于 -80 °C 冰箱中保存。

1.2.3 肾脏病理学检查 肾脏组织经 10% 甲醛固定、石蜡包埋,切成 3 μm 薄片后,行 HE 和 Masson 染色。邀请重庆医科大学附属第一医院病理科老师在不知实验分组情况下观察病理切片,每张切片选择左上、右上、左下、右下、中间 5 个肾小管间质视野,依据肾小管上皮细胞空泡变性、肾小管扩张、间质水肿、管型、间质纤维化、间质炎性细胞浸润等 6 项指标进行肾小管间质损伤评分,以各指标的均值作为肾间质损伤指数分值。评分标准:0 分,无异常病变;1 分,病变范围小于相应视野 25%;2 分,病变范围达到相应视野的 26%~50%;3 分,即病变范围高于相应视野的 50%^[5-7]。Masson 染色观察肾组织胶原沉积,每一样本在 200 倍光镜下取 20 个不重叠的区域,拍照,用 IPP 软件计算纤维化面积与肾间质总面积(去除肾小管管腔面积)比值,以各指标均值的均值作为判断肾间质纤维化积分的数值^[8-9]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾组织大体观察 Sham 组大鼠肾脏外观组织红润,大小正常,无明显变化。模型组梗阻侧肾脏体积明显增大,纵行剖

开后可见肾内大量坏死组织,皮质明显变薄,髓质明显萎缩。木犀草素组梗阻侧肾脏体积增大,纵行剖开后可见坏死组织,皮质轻微变薄,肾盂肾盏扩张,肾乳头萎缩。地塞米松组梗阻侧肾脏体积轻微增大,纵行剖开后可见清亮积液,皮质正常,肾盂肾盏轻微扩张。

2.2 大鼠肾脏指数 模型组肾脏质量和肾脏指数较 Sham 组有明显升高($P < 0.05$),木犀草素组较 Sham 组有明显升高($P < 0.05$);木犀草素组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),地塞米松组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);木犀草素和地塞米松组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),对各组大鼠肾脏指数的影响结果见表 1。肾脏指数=肾脏体质量/大鼠体质量。

表 1 对各组大鼠肾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	体质量(g)	肾脏质量(g)	肾脏指数(%)
Sham 组	221.62±30.07	0.96±0.08	0.43±0.03
模型组	195.63±22.76	1.42±0.16 ^a	0.73±0.20 ^a
木犀草素组	180.86±25.26	1.02±0.10 ^{ab}	0.57±0.07 ^{ab}
地塞米松组	206.13±20.11	0.96±0.11 ^b	0.53±0.04 ^b

^a: $P < 0.05$,与 Sham 组相比较;^b: $P < 0.05$;与模型组相比较。

2.3 生化指标变化 与 Sham 组大鼠相比,模型组血肌酐高($P < 0.05$),血尿素氮水平高($P < 0.05$);木犀草素组血尿素氮水平较 Sham 组高($P < 0.05$),同时较模型组低,差异无统计学意义($P > 0.05$),血肌酐水平较 Sham 组明显增高($P < 0.05$),较模型组低($P < 0.05$);地塞米松组血尿素氮水平、血肌酐水平较 Sham 组高,差异无统计学意义($P > 0.05$),但是两个指标都较模型组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对各组大鼠血尿素氮、肌酐分析结果见表 2。

表 2 各组大鼠血尿素氮、肌酐水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	BUN(mmol/L)	Scr(μmol/L)
Sham 组	5.41±0.92	38.83±8.36
模型组	10.79±0.98 ^a	96.78±10.79 ^a
木犀草素组	8.92±1.18 ^a	64.45±13.12 ^{ab}
地塞米松组	6.81±1.12 ^b	51.56±11.37 ^b

^a: $P < 0.05$,与 Sham 组相比较;^b: $P < 0.05$;与模型组相比较。

表 3 各组大鼠肾小管间质损伤指标($\bar{x} \pm s, n=8$)

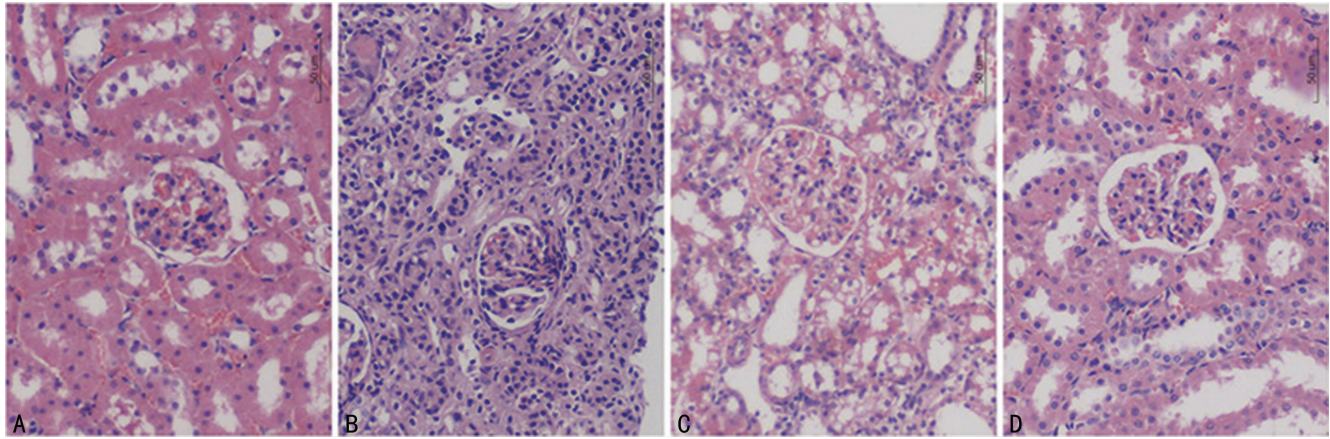
组别	肾小管间质损伤指数	间质纤维化积分(%)
Sham 组	1.24±0.38	3.30±0.97
模型组	9.82±2.26 ^a	32.53±2.31 ^a
木犀草素组	5.20±1.32 ^{ab}	24.10±2.12 ^{ab}
地塞米松组	3.58±1.02 ^{ab}	14.98±1.85 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与 Sham 组相比较;^b: $P < 0.05$;与模型组相比较。

2.4 大鼠肾脏组织病理改变 HE 染色中,Sham 组肾小管、肾小球无明显异常,肾小管周围无明显炎症细胞浸润,无水肿;模型组肾小管上皮细胞水肿明显,正常结构消失,可见大量管型,肾小球大小不一,充血明显,肾小管周围炎症细胞浸润明显,以淋巴细胞为主,间质充血明显,肾脏间质损伤指数和 Sham 组差异有统计学意义($P < 0.05$);木犀草素组肾小管局部有扩张变形,小管上皮细胞水肿,管中可见少量白细胞管型,肾小球轻微增大,靠近肾盂处充血明显,间质炎性细胞浸润明

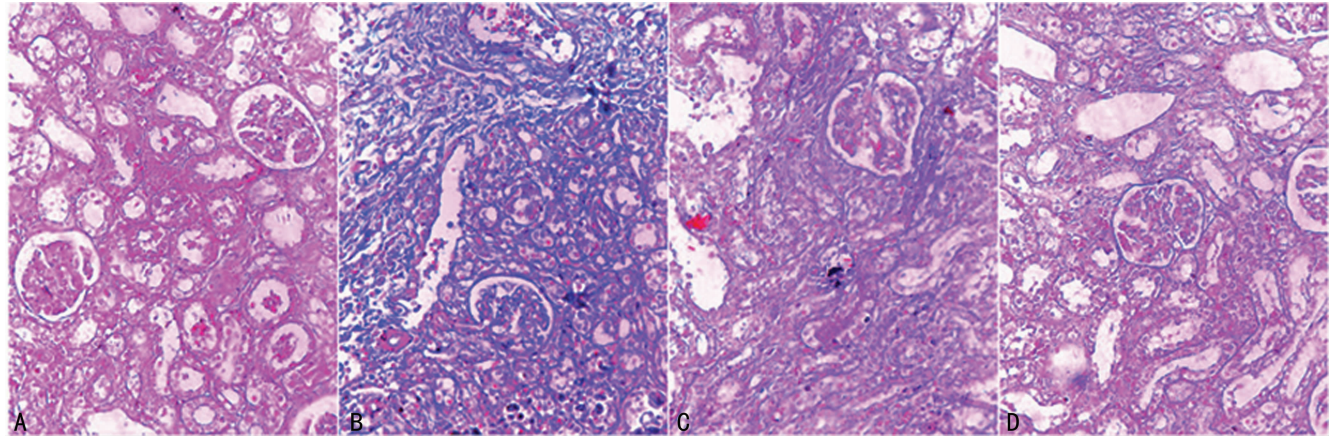
显,肾脏损伤指数较模型组下降明显($P < 0.05$),但是和 Sham 组仍有明显差异;地塞米松组靠近肾盂处肾小管轻度扩张变形,小管上皮细胞水肿不明显,靠近肾门处有局部炎症反应,间质略微充血,肾脏损伤指数较模型组下降明显,同时和 Sham 组比较仍有明显差异。Masson 染色见 Sham 组大鼠肾脏胶原纤维染色主要位于肾小球基底膜、系膜区和肾小管之间的毛细血管周围,而小管周围间质部分基本正常;模型组肾间质宽度增加,肾小球系膜区和周围间质蓝绿色胶原沉积显著,肾间质

纤维积分增高,与 Sham 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);木犀草素组基膜大多完整,胶原沉积明显,主要存在肾小球周围,肾小管间质胶原沉积较模型组下降明显,总体纤维积分较模型组也下降明显,但是和 Sham 组仍有明显差异。地塞米松组基膜基本完整,肾间质胶原沉积较多,主要在靠近肾小球处和肾门周围,总体纤维积分较模型组下降明显,但是和 Sham 组仍有明显差异。见表 3、图 1~2。



A:Sham 组;B:模型组;C:木犀草素组;D:地塞米松组。

图 1 各组大鼠术后 10 d 肾组织病理学改变(HE×200)



A:Sham 组;B:模型组;C:木犀草素组;D:地塞米松组。

图 2 各组大鼠术后 10 d 肾组织病理学改变(Masson×200)

3 讨论

慢性肾脏纤维化是导致终末期肾病的主要病理生理机制。肾小管间质的病变程度是决定 10 年肾脏存活率的最重要的影响因素,对肾脏的预后较肾小球病变更加明显,目前临床上对于治疗间质性肾炎的方法主要有支持治疗和免疫抑制剂治疗,糖皮质激素类药物常被用来治疗间质性肾炎,但是众所周知糖皮质激素类药物不良反应明显,容易继发引起多种疾病,如满月脸、骨质疏松等。木犀草素是一种黄酮类天然化合物,其具有多种药理特性,有研究表明木犀草素能够抑制核因子 κB (NF- κB) 和炎症介质 TNF- α 的释放^[10],同时木犀草素也具有很强的抗氧化能力,对 H_2O_2 氧化损伤的心肌有明显的保护作用^[11-12]。

单侧输尿管梗阻是一个成熟的肾纤维化实验模型,其特点是肾小管变形、间质炎症细胞浸润明显,最终导致肾脏间质的纤维化。本实验中按照文献要求建立单侧输尿管梗阻模型,模

型组大鼠梗阻侧肾脏体积明显增大,皮质明显变薄,髓质明显萎缩,肾脏指数较其余各组明显增高,肾功能明显下降,血尿素氮和肌酐水平较 Sham 组明显增高,病理切片 HE 染色可见肾小管上皮细胞水肿明显,正常结构消失,可见大量管型,肾小球大小不一,充血明显,肾小管周围炎症细胞浸润明显,以淋巴细胞为主,间质充血明显,肾小管间质损伤指数较 Sham 组明显增高;Masson 染色可见肾小球系膜区和肾小管周围间质蓝绿色胶原沉积显著,间质纤维化积分较 Sham 组明显增高,因此在本实验成功建立了单侧输尿管梗阻模型。本研究中,选择木犀草素作为实验组,和模型组对比木犀草素组大鼠肾脏功能有明显的改善,肾脏质量减小,肾脏指数明显减小,肾小管变形,肾小管间质炎症反应减轻,肾小管间质损伤指数明显减小,肾小球周围胶原沉积,肾小管周围间质沉积明显降低,间质纤维化积分明显降低,但是这些变化较地塞米松组有一定的差异,地塞米松组大鼠肾脏质量增大程度较木犀草素组轻,皮质

髓质变化亦不如木犀草素组严重,在肾脏功能保护上地塞米松明显优于木犀草素,该组大鼠肾脏功能较 Sham 组无明显异常变化,在肾小管间质损伤上地塞米松组大鼠肾小管变形、间质炎症反应、管型等变化较木犀草素组轻,肾小管间质损伤指数亦低于木犀草素组,两组胶原纤维大都沉积在肾小球周围,其间质纤维化积分较木犀草素组低。

综上所述,木犀草素不能够完全阻止或逆转单侧输尿管结扎后引起的肾脏功能和结构损伤,但是木犀草素能够较大幅度地改善单侧输尿管结扎大鼠的肾脏功能、减轻炎症反应和间质纤维化改变,但是其效果与地塞米松有一定的差距,其作用机制可能与地塞米松抑制 NF- κ B 基因的表达和炎症因子的释放相似;亦有可能通过其抗氧化的作用保护肾脏间质细胞,减轻炎症反应,这需更进一步的研究。木犀草素存在于多种常见食用植物和多种中草药中,具有价格便宜、原料易得等特点,其天然品已应用于临床止咳、平喘、祛痰、消炎、止痛,如白毛夏枯草、独一活等^[13-15]。由于临床上多用木犀草素天然品,而木犀草素几乎没有单独应用,所以对其梗阻性肾病间质纤维化的保护和治疗时的安全度、有效度和规范度等指标有待进一步的研究。虽然目前糖皮质激素类药物是作用最强、应用最广泛的治疗肾病的药物,但其存在不良反应大,并可形成激素依赖或激素抵抗,因此,寻求一种替代药物具有重要的临床意义,待木犀草素单独治疗梗阻性肾病的安全度、有效度和规范度研究清楚后,其有望成为延缓慢性肾脏疾病向终末期发展的糖皮质激素类辅助药物。

参考文献

- [1] Hu C, Kitts DD. Antioxidant, prooxidant, and cytotoxic activities of solvent-fractionated dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts in vitro [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(1): 301-310.
- [2] Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296(1): 181-187.
- [3] 韩炜,邢燕,康廷国. 木犀草素生物活性研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2010, 31(4): 60-62.
- [4] 刘克剑,张悦,李靖,等. 单侧输尿管梗阻法制作大鼠肾间质纤维化模型的改进 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(6): 410-412, 487.
- [5] Domitrovic R, Cvijanovic O, Pugel EP, et al. Luteolin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of Platinum accumulation, inflammation and apoptosis in the kidney [J]. *Toxicology*, 2013, 310: 115-123.
- [6] 卞保平,万英. 梗阻性大鼠肾组织 periostin 的表达及意义 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2012, 28(8): 628-632.
- [7] 潘明明,张明辉. 冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏纤维化的抑制作用及机制 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(5): 347-351.
- [8] 黄海长,闵亚丽,李惊子,等. 黄芪当归合剂及依那普利对结缔组织生长因子在肾间质纤维化中表达的比较研究 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2003, 19(3): 5-8.
- [9] 袁静,杨霞. 厄贝沙坦对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织缺氧诱导因子 1 α 和结缔组织生长因子表达的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(2): 119-123.
- [10] 范文辉,黄茂. 木犀草素对哮喘小鼠气道重塑的影响及机制探讨 [J]. *安徽医药*, 2006, 10(9): 647-649.
- [11] 闫庆峰,杨达宽,黄云超,等. 木犀草素对高脂血症大鼠血脂的影响 [J]. *昆明医学院学报*, 2007, 28(1): 23-26.
- [12] 周玲,解硯英,李杰,等. 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷对缺血缺氧培养乳鼠心肌细胞的保护作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2008, 19(4): 259-261.
- [13] 马行一,吴蔚桦,曾燕,等. 青蒿琥酯对 UUO 模型大鼠肾脏的抗炎作用及其机制研究 [J]. *重庆医学*, 2010, 40(12): 1514-1516.
- [14] 程根阳,李海剑. 罗格列酮对慢性环孢菌素肾病大鼠肾间质纤维化的保护作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2012, 28(8): 611-615.
- [15] Radford MJ, Donadio JJ, Berqstralh EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8(2): 199-207.

(收稿日期:2015-08-31 修回日期:2015-10-05)

(上接第 166 页)

- heat shock proteins 70 mRNA accumulation in the human heart during cardiac surgery [J]. *J Card Surg*, 1995, 10(4 Suppl): 400-406.
- [12] Diao LW, Zhao LL, Qi F, et al. Heat shock protein 70 induced by heat stress protects heterotopically transplanted hearts in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(4): 729-732.
 - [13] Yao YW, Zhang GH, Zhang YY, et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects against ischemia/reperfusion injury via increase of HSP70 and inhibition of NF- κ B [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16(3): 287-296.
 - [14] Dokladny K, Lobb R, Wharton W, et al. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of

HSP70 in rats: possible role of NF- κ B [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15(2): 153-163.

- [15] Ma L, Liu H, Xie Z, et al. Ginsenoside Rb3 protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury via the inhibition of JNK-mediated NF- κ B pathway: a mouse cardiomyocyte model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103628.
- [16] Youssef MI, Mahmoud AA, Abdelghany RH. A new combination of sitagliptin and furosemide protects against remote myocardial injury induced by renal ischemia/reperfusion in rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96(1): 20-29.

(收稿日期:2015-08-08 修回日期:2015-09-16)