

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.001

雷公藤红素对 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 Notch 信号通路表达的影响研究

刘 丹,王彩丽

(包头医学院第一附属医院肾内科,内蒙古包头 014010)

[摘要] **目的** 探讨雷公藤红素对 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 Notch 信号通路表达的影响。**方法** 建立 IgA 肾病大鼠模型,观察雷公藤红素治疗后大鼠血尿、蛋白尿情况,采用免疫组织化学和实时荧光定量 PCR 检测 Notch1、Jagged1 及其下游靶基因 Hes1、Hey1 的表达。**结果** 与对照组比较,IgA 肾病模型组血尿及 24 h 尿蛋白定量明显增高($P<0.05$);第 16、20 周末与模型组比较,贝那普利组及雷公藤红素干预组血尿、24 h 尿蛋白定量明显下降($P<0.05$),且贝那普利组及高剂量组较低剂量组下降明显($P<0.05$)。各组大鼠尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、谷丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草氨酸转氨酶(AST)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组大鼠肾小球、肾小管细胞质中 Notch1、Jagged1 仅有少量表达,在模型组大鼠肾脏组织的肾小球及肾小管细胞质中表达明显增加,贝那普利组、低剂量组、高剂量组 Notch1、Jagged1 的表达较模型组减弱,但仍高于对照组。而 Hes1、Hey1 在对照组大鼠肾小球、肾小管细胞质中基本无表达,在模型组大鼠肾脏组织的肾小球细胞核表达增加,贝那普利组、低剂量组、高剂量组 Hes1、Hey1 的表达较模型组减弱,但仍高于对照组。**结论** 雷公藤红素可以通过抑制 IgA 肾病大鼠肾组织中 Notch 信号通路的表达,减少血尿、蛋白尿的生成,从而对大鼠 IgA 肾病起到治疗作用。

[关键词] 肾小球肾炎,IgA;大鼠;Notch 信号通路;雷公藤红素**[中图分类号]** R692.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)25-3457-05

Effect of celastrol on the expression of Notch signaling pathway in rats with IgA nephropathy

Liu Dan, Wang Caili

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of celastrol on expression of Notch signaling pathway in renal tissues of IgA nephropathic rats. **Methods** Rat model of IgA nephropathy was established to observe the hematuria and proteinuria statuses in rats after celastrol treatment. Expression levels of Notch1, Jagged1 and downstream target genes Hes1, Hey1 were detected by immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with control group, hematuria and 24 hour urinary protein quantitative in IgA nephropathy model group was significantly increased ($P<0.05$); At the end of sixteenth, the 20 week, compared with the model group, hematuria, 24 hour urinary protein quantitative in benazepril group and tripterine intervention group were decreased significantly ($P<0.05$), compared with low dose group, benazepril group and high dose group were decreased significantly ($P<0.05$). The difference of urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) among groups had no statistically significant ($P>0.05$). The Notch1 Jagged1 in glomerular and renal tubular cells in cytoplasm of control group had only a small amount of expression, the expression of Notch1 and Jagged1 in glomerular and tubular cells in the renal tissue of the rats in the model group were significantly increased; compared with the model group, the expression of Notch1, Jagged1 in benazepril group, low dose group, high dose group were decreased, but still higher than the control group. While Hes1 and Hey1 in glomerular and renal tubular cell nucleus in cytoplasm of model group had no expression, the expression increased in glomerular cell nucleus of the model group, the expression of Notch1, Jagged1 in benazepril group, low dose group, high dose group were decreased, but still higher than the control group. **Conclusion** Celastrol can reduce the production of hematuria and proteinuria by inhibiting the expression of Notch signaling pathway in renal tissues of IgA nephropathic rats, and thereby exerts a therapeutic effect in rat IgA nephropathy.

[Key words] Glomerulonephritis, IgA; rats; Notch signaling pathway; celastrol

IgA 肾病是一种进展性肾病,临床表现多种多样,15%~40% 的患者在发病后 10~20 年内发展为终末期肾病(ESRD)^[1],给家庭及社会造成巨大经济负担。目前因其病因和发病机制仍不明确,治疗仅以对症及免疫抑制为主^[2]。近年来,随着研究的不断深入,发现 Notch 信号通路不仅仅在肾脏发育过程中起重要作用,还参与了肾小球疾病的发生^[3]。陈燕^[4]通过对 38 例 IgA 肾病患者研究发现,Notch1 和 Jagged1 参与了 IgA 肾病的肾间质纤维化的发生和发展,其表达随着肾间质纤维化程度的加重而增加。雷公藤制剂是已知的中药类免疫抑制剂,其抗炎及免疫抑制作用已通过大量实验被证实,应用于肾脏疾病中可减轻血尿、蛋白尿情况^[5]。雷公藤红素也是雷公藤多甙的有效成分之一^[6]。本研究通过建立 IgA 肾病大鼠模型,给

予雷公藤红素干预治疗,检测 Notch 信号通路家族成员的表达,观察雷公藤红素是否影响 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 Notch 信号通路的表达,缓解肾间质纤维化,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号:SCXK(京)2012-0001];牛血清清蛋白(BSA)购自美国 Sigma 公司;四氯化碳(CCl_4)购自天津化学试剂有限公司;脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司;兔抗 Notch1 多克隆抗体购自美国 Cell Signal 公司;兔抗 Jagged1 多克隆抗体、兔抗 Hey1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗 Hes1 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;组织 RNA 提取试剂盒及 real-time PCR 试剂盒购自上海诺伦生物医药技术有限公司;盐

表 1 各组大鼠不同时相尿红细胞计数比较($\bar{x}\pm s$,个/HP, $n=10$)

时间	对照组	模型组	贝那普利组	低剂量组	高剂量组
第 12 周末	0	12.40±3.42	10.30±3.06*	11.80±3.12*	10.70±3.09*
第 16 周末	0	14.70±3.16■	7.70±2.36□▽#	9.90±3.18□#	6.60±2.76□#△
第 20 周末	0	13.70±3.06	5.70±1.77▲▽	5.90±1.45○	4.40±0.97▲▽

*: $P<0.05$,与第 16 周末比较;□: $P<0.05$,与模型组第 16 周末比较;△: $P<0.05$,与低剂量组第 16 周末比较;■: $P>0.05$,▲: $P<0.01$,○: $P<0.05$,与模型组第 20 周末比较;▽: $P<0.05$,与低剂量组第 20 周末比较;▽: $P>0.05$,与高剂量组比较;#: $P<0.05$,与第 20 周末比较。

表 2 各组大鼠不同时相 24 h 尿蛋白定量的比较($\bar{x}\pm s$,g/24 h, $n=10$)

时间	对照组	模型组	贝那普利组	低剂量组	高剂量组
第 12 周末	0	11.69±0.28△	11.42±0.44△	11.58±0.54△	11.59±0.67△
第 16 周末	0	11.74±0.71△	7.22±0.28▲□	9.05±0.44▲	7.24±0.31▲□■
第 20 周末	0	11.62±0.52△	6.55±0.33▲□	8.22±0.30▲	6.58±0.35▲□■

△: $P<0.05$,与对照组比较;▲: $P<0.05$,与模型组比较;■: $P>0.05$,与贝那普利组比较;□: $P<0.05$,与低剂量组比较。

酸贝那普利片由北京诺华制药有限公司提供;雷公藤红素购自成都普菲德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 IgA 肾病动物模型建立及分组

参考汤颖等^[7]模型制备方法,选取 SPF 级别的 SD 雄性大鼠 60 只,分为对照组(14 只)和造模组(46 只)。造模组通过 BSA 600 mg/kg 隔日灌胃,持续 12 周,皮下注射 CCL₄ 0.1 mL+蓖麻油 0.5 mL,每周 1 次,持续 12 周,并于第 6、8 周尾静脉注射 LPS(每只 0.05 mg)的方法造模;对照组以等量蒸馏水灌胃及等量生理盐水注射。实验第 13 周,在造模的大鼠中抽取 6 只、对照组抽取 4 只处死,取肾脏进行光镜及免疫荧光检测,评价造模是否成功,造模成功后分为模型组、贝那普利组、雷公藤红素 1 mg⁻¹·kg⁻¹·d⁻¹干预组(低剂量组)、雷公藤红素 10 mg⁻¹·kg⁻¹·d⁻¹干预组(高剂量组),每组各 10 只。于实验第 13 周开始给予雷公藤红素及贝那普利干预,直至 20 周末。

1.2.2 标本采集

各组大鼠分别于第 12、16、20 周末,用代谢笼收集尿液,用于尿沉渣、蛋白尿的测定。实验结束后,各组大鼠由 10%水合氯醛麻醉后,开腹,腹主动脉采血行生化检测,取肾脏组织行免疫荧光、免疫组织化学、实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.3 免疫荧光检测

大鼠肾脏组织取出后用组织包埋剂 OCT 包埋后,放入液氮速冻,然后将冰冻切片制成 3 μm 厚的切片。用冷风机将冰冻切片吹干,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 3 min。滴加 FITC 标记的 IgA 抗体(1:50 稀释),37℃ 恒温箱孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。甘油封片,荧光显微镜读片。免疫荧光强度分级半定量标准参照国内外通用的 5 级法分级:低倍镜下不能显示,高倍镜下似乎可见,为±;低倍镜下似乎可见,高倍镜下可见,为+;低倍镜下可见,高倍镜下清晰可见,为++;低倍镜下清晰可见,高倍镜下耀眼,为+++;高倍镜下刺眼,为++++。

1.2.4 免疫组织化学检测

采用免疫组织化学 SP 染色法,检测肾脏组织中 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 的表达。将蜡块包埋固定的肾脏组织切片后脱蜡至水,采用高压修复法进行抗原修复,加入正常山羊血清封闭内源性生物素,甩掉血清滴加第一抗体(Notch1 1:200、Jagged1 1:200、Hes1 1:200、Hey1 1:200),4℃ 过夜,次日取出切片,室温下复温平衡后加生物素标记的二抗及链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水透明,中性树脂封片,显微镜进行观察。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测

应用 Total RNA Extraction Kit 提取试剂盒提取总 RNA。反转录反应体系总体积为 20 μL,按照反转录说明书合成 cDNA。引物序列分别为:Actb,上游引物 5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AAC A-3',下游引

物 5'-GTT GGT GTC GCA GTT GGA G-3';Notch1,上游引物 5'-GAC CGT GTG GCT TCC TTC TA-3',下游引物 5'-GTT GGT GTC GCA GTT GGA G-3';Jagged1,上游引物 5'-CAT GGC CTC CAA CGA TAC TC-3',下游引物 5'-GGT GAA TTT GCC TCC TGA CT-3';Hes1,上游引物 5'-GTG GGT CCT AAC GCA GTG TC-3',下游引物 5'-TGA TTA GCA GTG GCC TGA GC-3';Hey1,上游引物 5'-GGC TGA AGT TGC CCC TTA T-3',下游引物 5'-GCT GGG ATG CGT AGT TGT TG-3',均由上海生工生物工程公司合成。反应条件:95℃ 3 min 预变性;95℃ 12 s 变性;60℃ 40 s 退火,40 个循环结束。每个样本每个基因 3 个重复。每个样本的基因拷贝数以 Ct 值表示,各个基因的相对表达用 2^{-ΔΔCt} 进行统计。

1.3 统计学处理

所有采集的数据均由 SPSS17.0 软件进行统计处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,方差不齐者采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血尿、尿蛋白比较

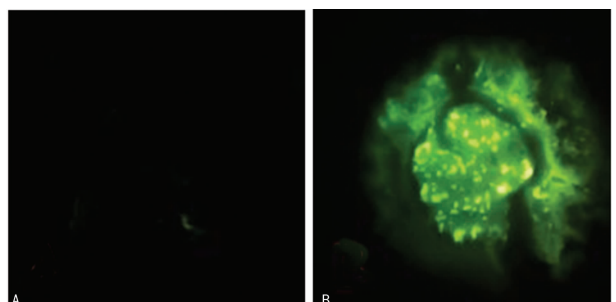
与对照组比较,模型组血尿及 24 h 尿蛋白定量明显增高($P<0.05$);第 16、20 周末与模型组比较,贝那普利组及雷公藤红素干预组血尿、24 h 尿蛋白定量明显下降($P<0.05$),且贝那普利组及高剂量组较较低剂量组下降明显($P<0.05$)。见表 1、2。

2.2 血生化指标分析

各组大鼠尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、谷丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草氨酸转氨酶(AST)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血生化指标比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

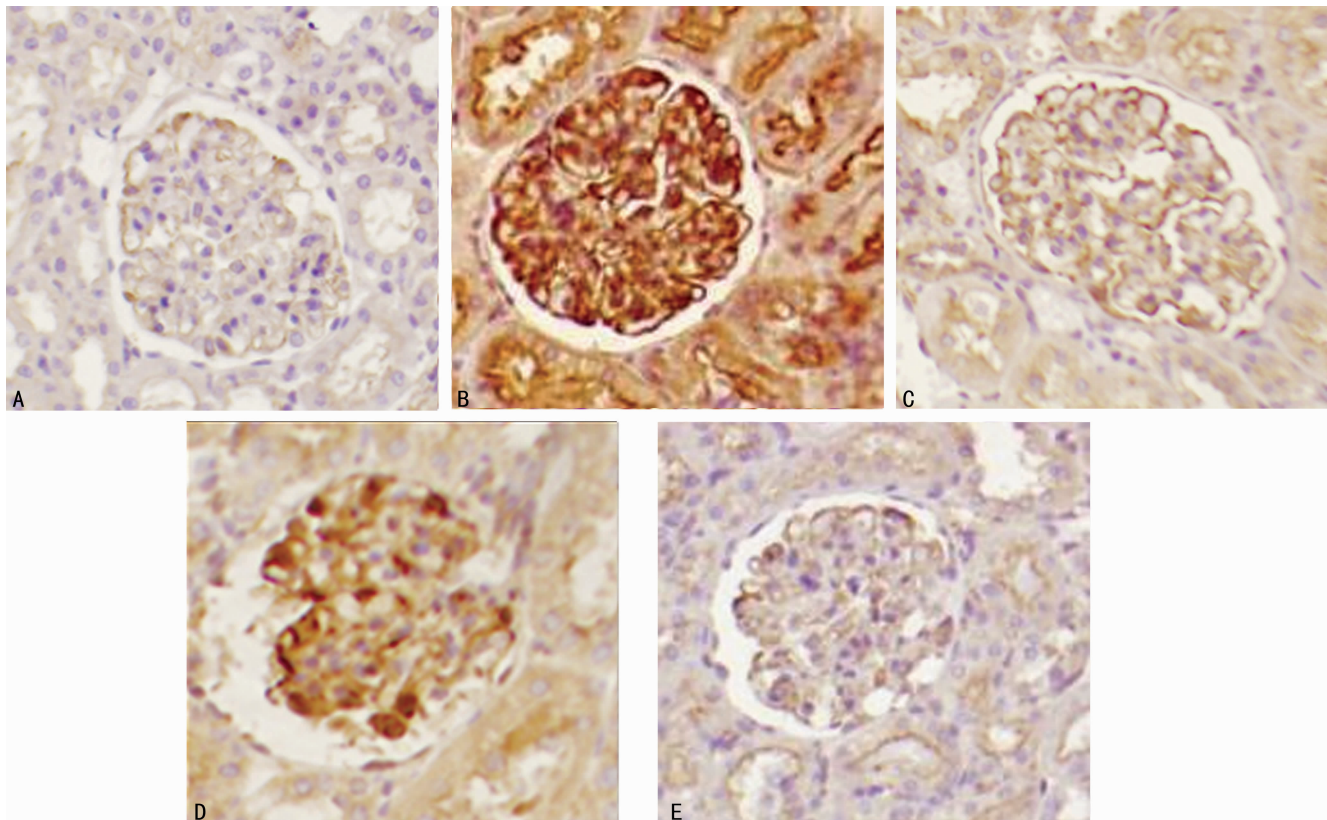
组别	BUN(mmol/L)	Scr(μmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	8.51±0.37	30.68±1.71	54.06±1.43	123.93±9.21
模型组	8.38±0.21	31.51±2.50	55.30±1.92	127.41±8.71
贝那普利组	8.53±0.25	31.37±2.34	55.67±2.32	123.73±9.66
低剂量组	8.64±0.27	30.01±2.17	53.42±3.01	124.97±10.23
高剂量组	8.47±0.32	30.77±2.01	55.45±3.07	126.45±8.44



A: 对照组; B: 模型组。

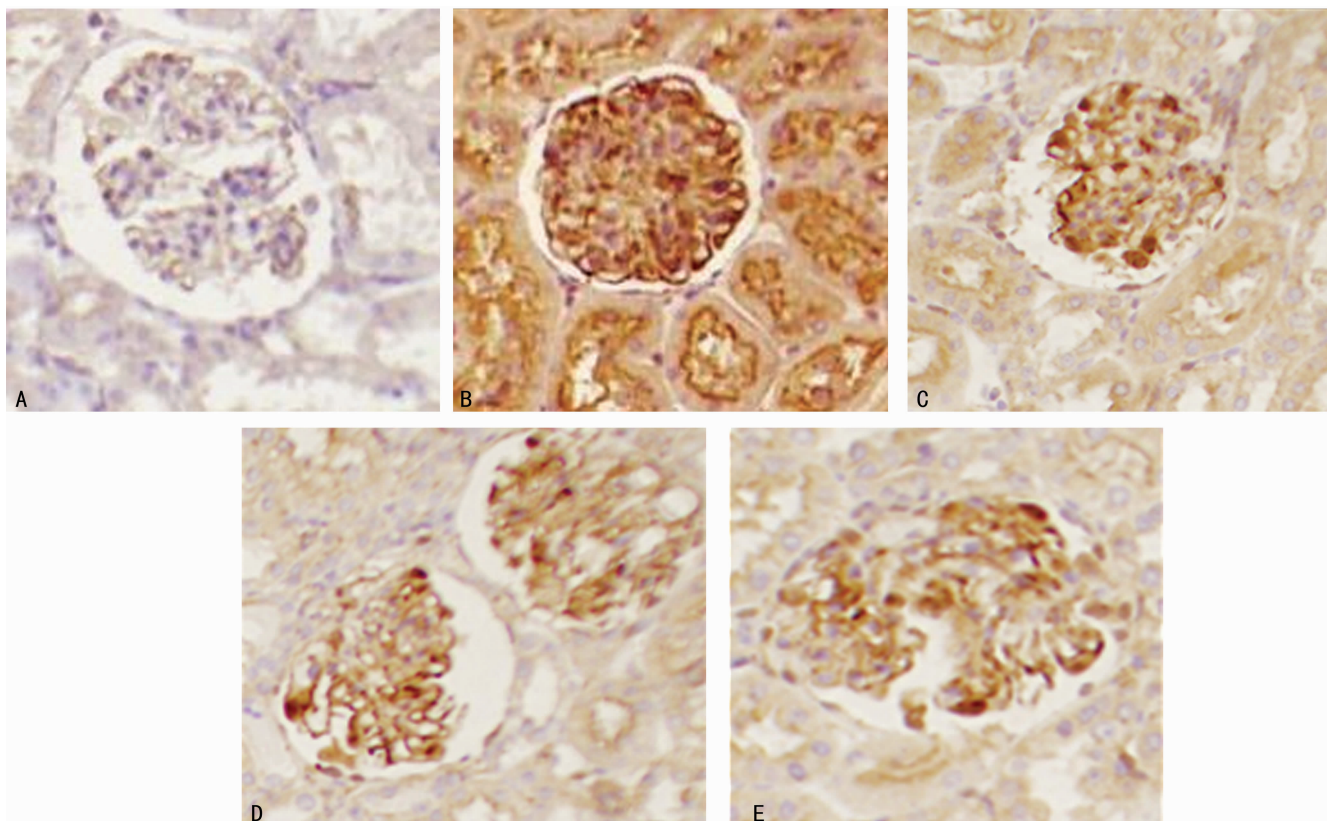
图 1 大鼠肾脏组织免疫荧光检测(×400)

2.3 肾脏组织免疫荧光检测 对照组肾小球系膜区无 IgA 沉积。模型组大鼠肾脏组织系膜区可见弥漫性颗粒状 IgA 沉积, 荧光强度为++~+++ ,造模成功。见图 1。



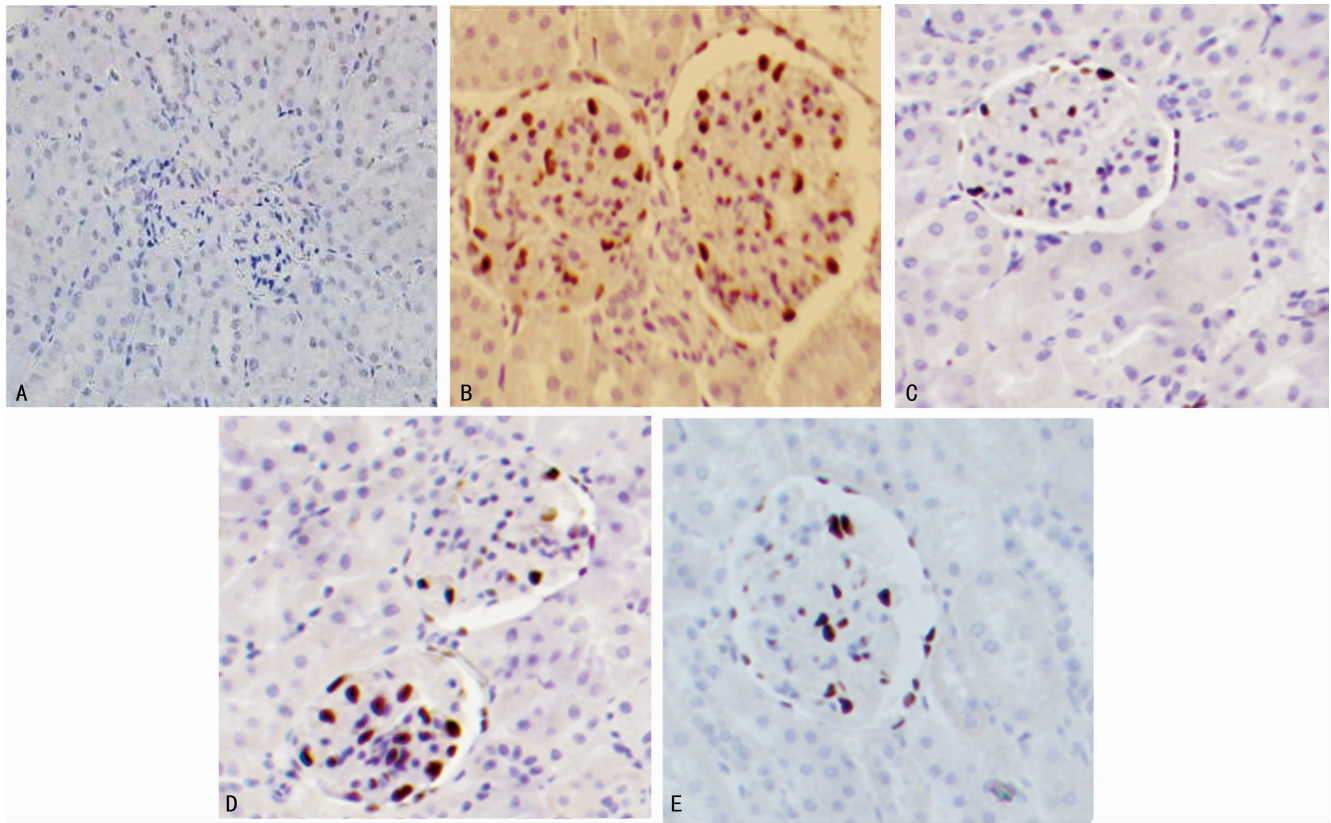
A: 对照组; B: 模型组; C: 贝那普利组; D: 低剂量组; E: 高剂量组。

图 2 各组大鼠肾脏组织 Notch1 免疫组织化学检测(×400)



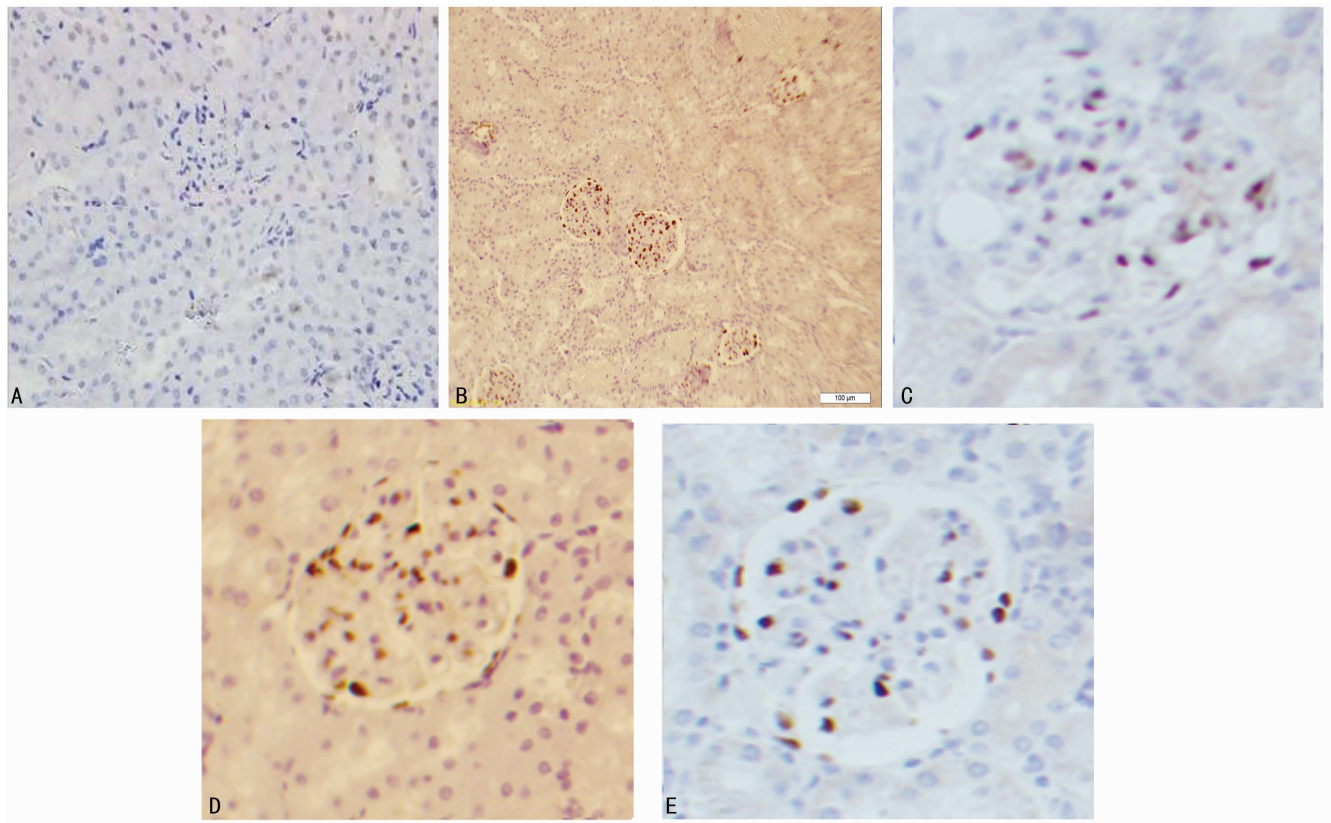
A: 对照组; B: 模型组; C: 贝那普利组; D: 低剂量组; E: 高剂量组。

图 3 各组大鼠肾脏组织 Jagged1 免疫组织化学检测(×400)



A: 对照组; B: 模型组; C: 贝那普利组; D: 低剂量组; E: 高剂量组。

图 4 各组大鼠肾脏组织 Hes1 免疫组织化学检测(×400)



A: 对照组; B: 模型组; C: 贝那普利组; D: 低剂量组; E: 高剂量组。

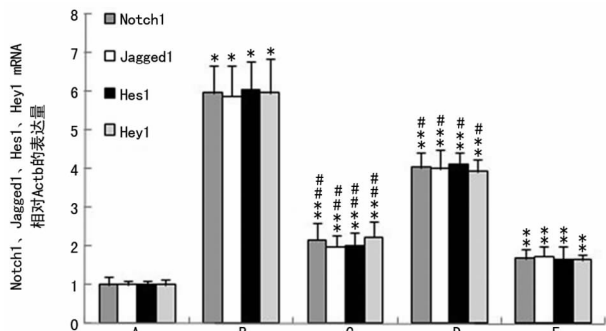
图 5 各组大鼠肾脏组织 Hey1 免疫组织化学检测(×400)

2.4 肾脏组织免疫组化检测 免疫组织化学染色以肾小球、肾小管及间质出现棕黄色颗粒为阳性表达。对照组大鼠肾小球、肾小管细胞质中 Notch1、Jagged1 仅有少量表达,在模型组

大鼠肾脏组织的肾小球及肾小管细胞质中表达明显增加,贝那普利组、低剂量组、高剂量组 Notch1、Jagged1 的表达较模型组减弱,但仍高于对照组。而 Hes1、Hey1 在对照组大鼠肾小球、

肾小管细胞质中基本无表达,在模型组大鼠肾脏组织的肾小球细胞核表达增加,贝那普利组、低剂量组、高剂量组 Hes1、Hey1 的表达较模型组减弱,但仍高于对照组。见图 2~5。

2.5 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 表达 实时荧光定量 PCR 结果显示:与对照组比较,模型组大鼠肾脏组织 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 表达水平增加 ($P < 0.01$);贝那普利组、低剂量组、高剂量组大鼠肾脏组织 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 表达水平较模型组降低 ($P < 0.05$),但仍高于对照组,其中贝那普利组、高剂量组大鼠肾脏组织 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但与低剂量组比较 Hey1 mRNA 表达水平降低明显 ($P < 0.05$)。见图 6。



A: 对照组; B: 模型组; C: 贝那普利组; D: 低剂量组; E: 高剂量组; * : $P < 0.01$, 与对照组比较; * * : $P < 0.05$, 与模型组比较; # : $P < 0.05$, 与贝那普利组、高剂量组比较; # # : $P > 0.05$, 与高剂量组比较。

图 6 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 在各组大鼠肾脏组织中的表达

3 讨论

IgA 肾病发病率相对较高,是全球范围内常见的一种原发性肾小球肾炎。在我国,IgA 肾病占原发性肾小球疾病的 40.0%~47.2%,而且有报道称该比例仍有明显的上升趋势^[1,8]。部分 IgA 肾病患者在出现首发症状后,每年约有 1.5% 发展为 ESRD^[9],但因其发病机制不明,临床和病理表现多样,没有公认、统一的治疗规范^[10]。因此,了解其发生、发展规律,并以此作为依据制订科学的预防和治疗措施,可更好地控制该病的发生、发展,避免或延缓患者发展至 ESRD 阶段。

Notch 信号通路是一条相对保守的但广泛存在于细胞间的信号传导通路,在哺乳动物体内,它参与了肾脏发育全过程。近年来,对于 Notch 信号通路的研究不仅仅是其在肾脏发育过程中的作用,更多的是其在肾小球疾病中的作用。现已有其与急性肾损伤、糖尿病肾病、肾小管间质纤维化、肾脏肿瘤等疾病的相关性研究报道^[11]。但与其与 IgA 肾病的发生和发展研究甚少。本实验通过联合应用 BSA、CCL₄、LPS 的方法成功建立了 IgA 肾病大鼠模型。观察 Notch 信号通路中重要组成成员 Notch1 和 Jagged1 及其下游靶基因 Hes1、Hey1 在 IgA 肾病大鼠肾脏组织中的表达,证明 Notch 信号通路在 IgA 肾病大鼠模型中被激活,参与疾病的发生。此结果在临床研究及治疗中

提供了一个新的信息,可以通过阻断或抑制 Notch 信号传导途径来减缓疾病的进展^[12]。

雷公藤红素是我国传统中药雷公藤的一种活性成分,雷公藤制剂具有抗炎免疫调节作用,不仅对类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、癌症等有独特疗效,在肾脏疾病中也发挥一定作用,可以使肾脏病变减轻,血尿、蛋白尿减轻,但其治疗机制尚不明确。本实验通过建立 IgA 肾病大鼠模型,应用雷公藤红素干预后 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 的表达明显减少,其中高剂量组在下调 Notch1、Jagged1、Hes1、Hey1 mRNA 的表达上与贝那普利组无差别,但其作用优于低剂量组。由此可见,在 IgA 肾病的治疗上,雷公藤红素可以通过调节 Notch 信号通路的表达起到治疗作用。并且在 2012 年 IgA 肾病的 KDIGO 指南也对肾素-血管紧张素系统(RAS)阻断剂在 IgA 肾病治疗中的作用给予了充分的肯定^[13]。因此,本实验选用贝那普利作为对照药物,前瞻性评价雷公藤红素在 IgA 肾病中的治疗疗效及安全性,通过实验对比,证明雷公藤红素与贝那普利在治疗大鼠 IgA 肾病中有相同疗效。

参考文献

- [1] Donadio JV, Grande JP. IgA nephropathy[J]. N Engl J Med, 2002, 20(347): 738-748.
- [2] 王莉, 刘杰. IgA 肾病的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(15): 2778-2781.
- [3] 黄仁发, 吴金玉, 周巧玲. Notch 信号通路与肾脏疾病[J]. 医学综述, 2013, 19(22): 4038-4041.
- [4] 陈燕. Notch 信号通路在 IgA 肾病肾间质纤维化中的变化及意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [5] 张小蒙. 雷公藤的药理作用和临床应用研究进展[J]. 临床合理用药, 2012, 78(5): 180.
- [6] 陈铭祥, 冯玉静, 王定勇, 等. 雷公藤红素的研究进展[J]. 中成药, 2010, 32(3): 473-476.
- [7] 汤颖, 娄探奇, 成彩联, 等. 实验性 IgA 肾病模型的改进[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(2): 184-187.
- [8] 刘刚, 马序竹, 邹万忠, 等. 肾活检患者肾脏病构成十年对比分析[J]. 临床内科杂志, 2004, 31(12): 834-838.
- [9] 李占亭, 杨洁, 孙脊峰, 等. IgA 肾病的治疗进展[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(10): 952-953.
- [10] 苏值勇. IgA 肾病治疗进展[J]. 中外医学研究, 2011, 9(7): 122-123.
- [11] 何攀, 邵凤民. Notch 信号通路与肾脏疾病[J]. 医药论坛杂志, 2014, 35(1): 136-138.
- [12] 崔路可, 曹灵, 樊均明. 足细胞 Notch 信号通路研究进展[J]. 西南军医, 2012, 14(4): 643-645.
- [13] 张宏. KDIGO 指南解读: IgA 肾病治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(12): 925-927.

(收稿日期: 2016-03-18 修回日期: 2016-05-06)

