

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.007

丁苯酞对肾间质纤维化的干预作用及机制研究*

曹义甫¹, 王秀芬^{2△}, 宋培¹, 解坤³, 武佳¹, 刘翠红¹, 李英²

(1. 河北省石家庄市第三医院肾内科 050031; 2. 河北医科大学第三医院肾内科, 石家庄 050000;
3. 河北省石家庄市心脑血管病医院内一科 050000)

[摘要] **目的** 探讨丁苯酞的肾保护机制及核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)-抗氧化还原反应元件(Nrf2-ARE)通路在肾间质纤维化中的作用。**方法** 清洁级 CD-1 小鼠分为 4 组:假手术组、模型组、治疗组、阳性对照组。假手术组、模型组均给予等量生理盐水灌胃。治疗组、阳性对照组分别给予丁苯酞、贝那普利灌胃。将各组小鼠分别于术后第 3、7、14 天处死,取梗阻侧肾组织,通过免疫组织化学染色、RT-PCR 等实验手段检测肾组织 I 型胶原蛋白、Nrf2 及 γ -GCS 蛋白及 mRNA 的表达水平。并将 Nrf2 与 γ -GCS 及 I 型胶原蛋白与 γ -GCS 进行相关性分析。**结果** 免疫组织化学及 RT-PCR 结果均显示模型组 I 型胶原蛋白 mRNA 及蛋白较假手术组有明显升高,并且随着梗阻时间的延长表达逐渐增多。治疗组及阳性对照组小鼠在各时间点较模型组表达显著减少。动态观察 Nrf2 mRNA 的表达,结果显示:与同期假手术组相比,术后 3、7、14 d 模型组小鼠肾组织中 Nrf2、 γ -GCS、I 型胶原蛋白 mRNA 表达均增加,给予丁苯酞干预后,Nrf2 mRNA 在 7、14 d 时治疗组与模型组比较表达均显著增加($P < 0.05$),治疗组 Nrf2 在各时间点表达均强于阳性对照组($P < 0.05$)。RT-PCR 学检测 γ -GCS mRNA 变化趋势同于 Nrf2,其肾保护效应随时间延长呈增强趋势。相关性分析显示:Nrf2 与 γ -GCS 呈正相关($r = 0.950, P < 0.05$), γ -GCS 与 I 型胶原蛋白呈负相关($r = -0.629, P < 0.05$)。**结论** 丁苯酞有抗肾间质纤维化作用,机制可能与激活 Nrf2-ARE 信号通路,提高肾间质中 Nrf2、抗氧化酶 γ -GCS 活性水平有关。

[关键词] 肾间质纤维化;核因子 E2 相关因子 2; γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶;胶原 I 型;丁苯酞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)06-0742-04

Effect mechanism study of butylphthalide on renal interstitial fibrosis*

Cao Yifu¹, Wang Xiufen^{2△}, Song Pei¹, Xie Kun³, Wu Jia¹, Liu Cuihong¹, Li Ying²

(1. Department of Urology, the Third Hospital of Shijiazhuang city, Shijiazhuang, Hebei 050031, China;
2. Department of Urology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China;
3. First Department of Medicine, the Hospital of Cardio-Cerebrovascular Disease, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the rule of the Nrf2-ARE in renal interstitial fibrosis and the mechanism of butylphthalide on renal protective effect. **Methods** Seventy-two male CD-1 mice were divided into 4 groups, Sham group, UUO group, NBP group, ACEI group. The Sham group and UUO group were gavaged with physiological saline. The NBP group was gavaged with butylphthalide. The ACEI group was gavaged with benazepril. After 3, 7, 14 days, 6 mice were executed and collection of kidney tissue. The expression of Nrf2, γ -GCS and type I collagen were detected by immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot. The correlation of Nrf2 and γ -GCS was assessed by linear regression. **Results** The expression of type I collagen in UUO group was increased compared with the Sham group, However, the expression of Type I collagen in NBP group or ACEI group were reduced compared with the UUO group. Compared with Sham group, the expression of Nrf2 mRNA, γ -GCS mRNA and type I collagen mRNA in uuogroup were increased in 3, 7, 14 days after surgery. Compared with UUO group at 7th, 14u day, the level of Nrf2 mRNA were apparently increased in NBP group ($P < 0.05$). It was a positive correlation between the Nrf2 and γ -GCS and negative correlation between the γ -GCS and Type I collagen. **Conclusion** The renal protective effect of butylphthalide in the renal interstitial fibrosis was more predominant than benazepril. The roles maybe occurred through increased the expression of Nrf2 and γ -GCS and alleviated the expression of Type I collagen in nephridial tissue.

[Key words] renal interstitial fibrosis; nuclear factor E2-related factor2; γ -GCS; type I collagen; butylphthalide

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis)是各种慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)的共同归属,是慢性肾衰竭的主要原因之一。其中氧化应激在肾间质纤维化的发生发展中起重要作用。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor2, Nrf2)-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路是近年来发现的非常重要的抗氧化应激通

路,在机体抗氧化应激中起关键作用。目前 Nrf2-ARE 信号通路在神经损伤、癌症、哮喘等领域研究较多^[1-3],而肾脏疾病的研究则侧重在糖尿病肾病及肾脏缺血再灌注损伤等方面。丁苯酞具有抗氧化、抗炎、保护线粒体的功能,在缺血性脑卒中中广泛应用,在肾保护方面未见报道。

本研究拟通过建立单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral

* 基金项目:河北省医学科研重点课题计划(ZD20140125)。 作者简介:(1977—),主治医师,硕士,主要从事梗阻性肾和血液透析研究。

△ 通信作者, E-mail: wangxiufen@medmail.com.cn。

obstruction, UUO) 诱导的小鼠肾间质纤维化模型, 结合免疫组织化学、PCR 等检测手段, 观察梗阻性肾病小鼠肾脏中 Nrf2、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)、I 型胶原蛋白表达情况并探索丁苯酞抗氧化应激的作用机制及其对梗阻性肾病小鼠肾脏保护作用。

1 材料与与方法

1.1 材料与主要试剂 焦碳酸二乙酯(美国 Amresco 公司), 总 RNA 提取试剂、PCR 反应体系、DNA Marker(日本 Takara 公司), 756MC 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), PE9600 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司), 电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂), 紫外透射仪(北京鼎国昌盛生物技术有限公司), 超低温保存箱(MDF-382E, 日本 Sanyo 公司), 高速冷冻离心机(1-15K, 美国 Sigma 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 UUO 小鼠模型的制备 清洁级雄性 CD-1 小鼠 72 只, 将小鼠分为 4 组: 假手术组、模型组、治疗组、阳性对照组。采用结扎单侧输尿管的手术方法制造梗阻性肾病模型。假手术组、模型组均给予等量生理盐水灌胃。治疗组、阳性对照组分别给予丁苯酞 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 贝那普利 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。实验期间动物自由摄食水, 每天注意观察小鼠的一般状况, 有无饮食及活动异常。

1.2.2 标本的采集和处理 各组分别于术后第 3、7、14 天处死 6 只小鼠, 取梗阻侧肾组织。用生理盐水冲洗后放入 10% 甲醛中固定, 待做免疫组织化学染色; 部分肾组织放入用焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理过的铝箔纸中, 后移入液氮迅速冷冻, 最后 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存用于 RT-PCR 检测。

1.2.3 I 型胶原蛋白的免疫组织化学检测 通过二甲苯和梯度乙醇对组织切片进行脱蜡及水化, 自来水冲洗 5 min, 0.3% 去离子 H_2O_2 孵育 30 min, 以阻断内源性过氧化物酶, 缓冲液冲洗 5 min, 血清封闭, 倾去多余的血清, 勿洗, 组织在缓冲液稀释的一抗中孵育 30 min, 缓冲液冲洗切片 5 min; 组织在滴加生物素标记的二抗中孵育 30 min, 缓冲液冲洗切片 5 min, 组织置于 VECTASTAIN ABC 试剂 30 min, 缓冲液冲洗切片 5 min, 组织在过氧化物酶底物溶液中孵育, 直到所需的染色强度, 自来水冲洗组织, 复染、脱水、透明。使用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件对免疫组织化学实验结果进行分析, 每张切片选取 5 个视野对肾组织的病变情况进行积分光密度分析, 然后进行统计学处理。

1.2.4 Nrf2、 γ -GCS、I 型胶原蛋白 mRNA 检测 首先进行总 RNA 的提取, 逆转录反应, 并行 PCR 反应 I 型胶原蛋白退火温度为 $54 \text{ }^\circ\text{C}$, 上游引物 $5'$ -GAG ACA GGC GAA CAA GGT GA- $3'$, 下游引物 $5'$ -CTC AAG GTC ACG GTC ACG AA- $3'$, 扩增片段为 399 bp; Nrf2 退火温度为 $52 \text{ }^\circ\text{C}$, 上游引物 $5'$ -GCC TTT TCT CCG CCT CTA AGT- $3'$, 下游引物 $5'$ -CTG GGA CTG TAG TCT GGC G- $3'$, 扩增片段为 246 bp; γ -GCS 退火温度为 $53 \text{ }^\circ\text{C}$, 上游引物 $5'$ -CAT CCT CCA GTT CCT GCA CA- $3'$, 下游引物 $5'$ -CTC CGA TGC CGG ATG TTT CT- $3'$, 扩增片段为 513 bp; GAPDH 退火温度为 $55 \text{ }^\circ\text{C}$, 上游引物 $5'$ -CAT CAT CTC CGC CCC TTC TG- $3'$, 下游引物, $5'$ -TTG AGA GAA ATG CCA GCC CC- $3'$, 扩增片段为 555 bp。分装并稀释 real-time PCR 引物, 进行 RT-PCR 反应, PCR 产物电泳。使用 Quantity-One 凝胶图象分析软件对目的电泳条

带进行分析, 以相应的内参电泳条带作为参照, 结果以两者之积分吸光度的比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验, 相关性分析采用 Pearson 相关分析, $r > 0.7$ 为高度正相关, $0 < r < 0.4$ 为低度正相关, $-1 < r < 0$ 为负相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

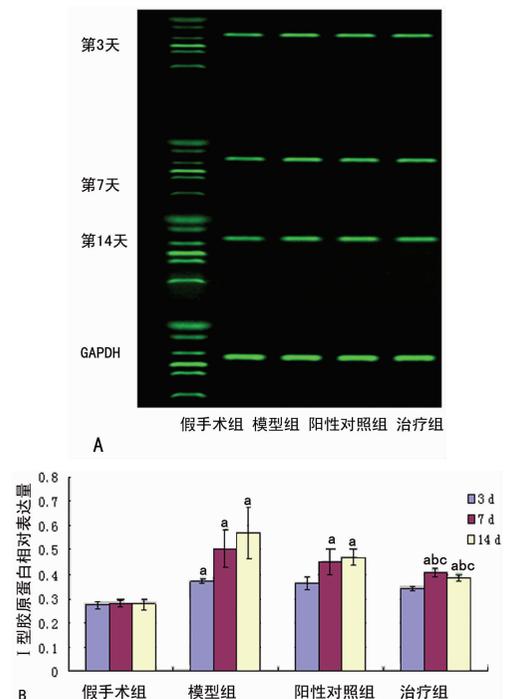
2.1 I 型胶原蛋白免疫组织化学 通过研究可看出, 在假手术组小鼠肾小管上皮细胞质中, I 型胶原蛋白有极少量表达。模型组表达呈强阳性, 并且随着梗阻时间的延长, 病变进一步加重, I 型胶原蛋白表达逐渐增多, 至 14 d 时表达达到高峰。治疗组、阳性对照组小鼠在各时间点较模型组表达显著减少 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组 I 型胶原蛋白的免疫组织化学结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	5	0.068 0 \pm 0.009 7	0.063 9 \pm 0.004 3	0.063 9 \pm 0.004 7
模型组	5	0.131 9 \pm 0.005 5 ^a	0.157 9 \pm 0.018 5 ^a	0.211 0 \pm 0.056 4 ^a
阳性对照组	5	0.121 1 \pm 0.038 6 ^{ab}	0.123 1 \pm 0.000 0 ^{ab}	0.081 4 \pm 0.012 5 ^b
治疗组	5	0.110 8 \pm 0.033 9 ^{ab}	0.099 2 \pm 0.008 3 ^{abc}	0.072 8 \pm 0.035 3 ^{bc}

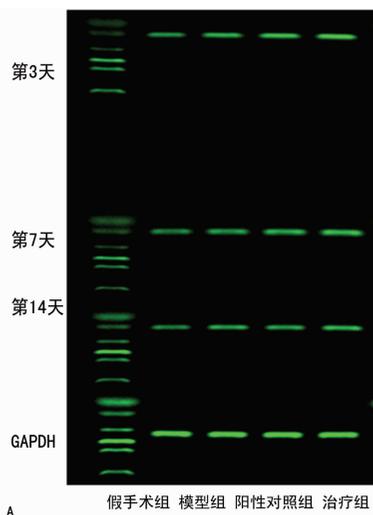
^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与阳性对照组比较。

2.2 I 型胶原蛋白 RT-PCR 结果 与同期假手术组比较, 术后 3、7、14 d 模型组小鼠肾组织中 I 型胶原蛋白 mRNA 表达均增加 ($P < 0.05$), 给予丁苯酞、贝那普利干预后, 与同期模型组相比, 治疗组、阳性对照组小鼠中 I 型胶原蛋白 mRNA 表达减少 ($P < 0.05$), 治疗组 I 型胶原蛋白 mRNA 表达少于阳性对照组 ($P < 0.05$)。见图 1。



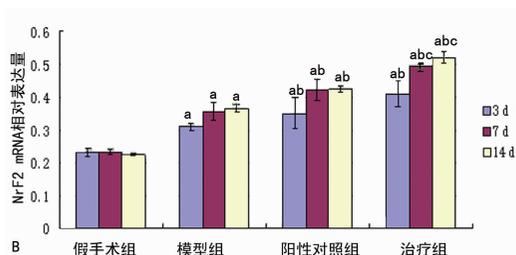
A: PCR 凝胶电泳图; B: PCR 分析图; ^a: $P < 0.05$, 与同期假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, 与同期模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与同期阳性对照组比较。

图 1 各组 I 型胶原蛋白 RT-PCR 结果



A

假手术组 模型组 阳性对照组 治疗组

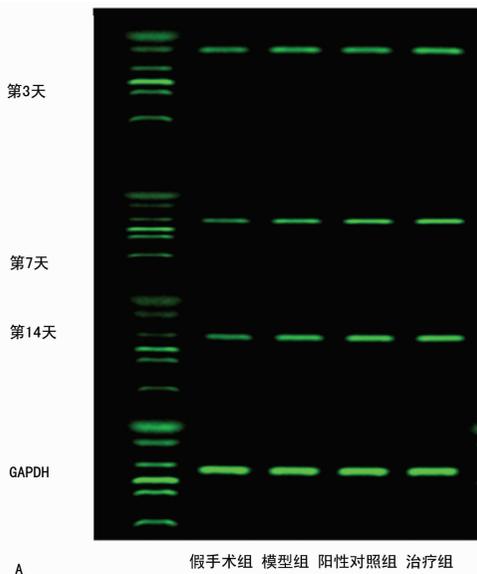


B

假手术组 模型组 阳性对照组 治疗组

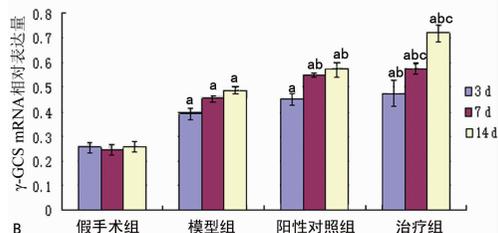
A: PCR 凝胶电泳; B: PCR 分析图; ^a: $P < 0.05$, 与同期假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, 与同期模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与同期贝那普利组比较。

图 2 各组 Nrf2 RT-PCR 结果



A

假手术组 模型组 阳性对照组 治疗组



B

假手术组 模型组 阳性对照组 治疗组

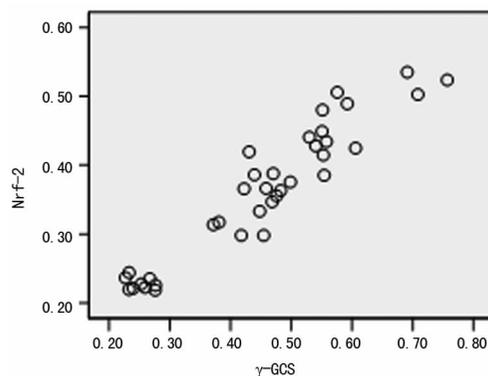
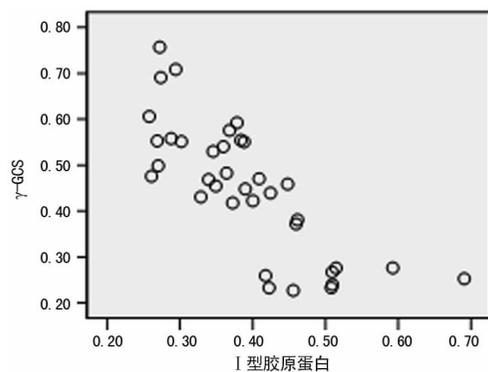
A: PCR 凝胶电泳图; B: PCR 分析图; ^a: $P < 0.05$, 与同期假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, 与同期模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与同期贝那普利组比较。

图 3 各组 γ -GCS RT-PCR 结果

2.3 Nrf2 RT-PCR 结果 与同期假手术组相比, 术后 3、7、14 d 模型组小鼠肾组织中 Nrf2 mRNA 表达均增加 ($P < 0.05$), 给予丁苯酞、贝那普利干预后, 与同期模型组相比, 治疗组、阳性对照组小鼠中 Nrf2 mRNA 表达增加更加明显, 治疗组 Nrf2 表达强于阳性对照组 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 γ -GCS RT-PCR 结果 与同期假手术组相比, 术后 3、7、14 d 模型组小鼠肾组织中 γ -GCS mRNA 表达均增加 ($P < 0.05$), 给予丁苯酞、贝那普利干预后, 与同期模型组相比, 治疗组、阳性对照组小鼠中 γ -GCS mRNA 表达增加更明显 ($P < 0.05$), 治疗组 γ -GCS mRNA 表达强于阳性对照组 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.5 相关性分析 对 γ -GCS mRNA 表达水平分别与 Nrf2 mRNA、I 型胶原蛋白 mRNA 表达情况进行相关分析, 结果表明: Nrf2 mRNA 与 γ -GCS mRNA 表达水平呈正相关 ($r = 0.950, P < 0.05$), γ -GCS mRNA 与 I 型胶原蛋白 mRNA 表达水平呈负相关 ($r = -0.629, P < 0.05$), 见图 4、5。

图 4 Nrf2 mRNA 与 γ -GCS mRNA 表达水平的相关性分析图 5 γ -GCS mRNA 与 I 型胶原蛋白 mRNA 表达水平的相关性分析

3 讨论

许多研究表明, 在终末期肾病的发展进程中, 肾小管间质病变比肾小球病变所起作用更突出。观察肾小管间质在病理学检查中的损害程度, 对于患者的预后具有重要的指导意义。因此, 寻找针对肾脏纤维化的各种治疗措施是当前肾脏病研究领域的重点与热点。

本实验选取清洁级 CD-1 小鼠结扎左侧输尿管诱导肾间质纤维化模型^[4]。分别于第 3、7、14 天取梗阻侧肾组织, 用于免疫组织化学染色或 RT-PCR, 动态观察肾脏 Nrf2、 γ -GCS、I 型胶原蛋白的表达水平。旨在观察丁苯酞对肾间质纤维化

Nrf2-ARE 信号通路的影响,试图从蛋白及转录水平研究丁苯酞防治肾间质纤维化的可能机制。

γ -GCS 是机体重要的抗氧化酶,受 Nrf2-ARE 信号通路转录调节,因此本研究选用上述指标衡量机体抗氧化应激状态,并选用 I 型胶原蛋白作为衡量肾间质纤维化的指标。结果发现 γ -GCS 分子在模型组小鼠不同时间点蛋白均有表达,且随实验时间的延长表达进一步增多,呈现时间依赖性,与 Nrf2 的表达含量呈正相关,与 I 型胶原蛋白的表达水平呈负相关,从而证实 γ -GCS 有抑制肾间质纤维化的作用,且在短期内证实存在随梗阻时间的延长、其浓度越高,即抑制肾纤维化程度也越强。提示 γ -GCS 参与了肾间质纤维化的过程。

Nrf2 是转录因子 CNC 家族成员之一,包括 6 个高度保守的环氧氯丙烷(ECH)的同源结构域。Nrf2 是细胞中与氧化应激反应密切相关的一种细胞因子,最开始被确认具有预防肿瘤的功能。越来越多的证据证实了 Nrf2 能对抗多种疾病的病理状态^[5-12]。目前,Nrf2/ARE 信号通路在肾脏疾病的研究则侧重在糖尿病肾病等方面,而在梗阻性肾病方面的研究相对较少。本实验显示 Nrf2 分子在模型组小鼠不同时间点蛋白均有表达,且随实验时间的延长表达进一步增多。提示在模型小鼠中,氧化应激反应分子 Nrf2 被激活,短期呈时间依赖性,但受实验模型所限,仅观察了短期 14 d 时间内的基因表达水平。

本研究通过 RT-PCR 技术、免疫组织化学技术等观察 Nrf2、 γ -GCS 及 I 型胶原蛋白在应用丁苯酞治疗后的表达变化,与模型组比较,治疗组第 7 天肾小管上皮细胞及肾间质损伤开始改善,I 型胶原蛋白表达开始减少,到第 14 天时疗效更佳,提示丁苯酞在减轻肾间质纤维化作用的同时,存在明显的时间依赖性。进一步检测肾组织中 Nrf2 及 γ -GCS 表达,发现与模型组比较,治疗组二者升高明显,并且也存在时间依赖性。提示丁苯酞不管从基因水平还是从蛋白水平对肾间质纤维化均有改善作用。从而推测丁苯酞治疗肾间质纤维化的机制与激活 Nrf2-ARE 信号通路,上调抗氧化酶 γ -GCS 有关^[13]。

本研究中同时应用贝那普利作为对照观察发现,阳性对照组在第 7、14 天的治疗效果不如治疗组。推测贝那普利抑制血管紧张素 II 后的抗肾间质纤维化作用不如丁苯酞抑制活性氧(ROS)引起的肾间质损伤作用强。

总之,在肾间质纤维化的发生发展过程中 Nrf2-ARE 信号通路起到了保护作用,并进一步证实 Nrf2、 γ -GCS 能延缓肾间质纤维化的进展。丁苯酞有抗肾间质纤维化作用,机制可能与激活 Nrf2-ARE 信号通路,提高肾间质中 Nrf2、 γ -GCS 活性水平有关。短期观察丁苯酞的肾保护作用优于贝那普利。

参考文献

[1] 卢明珍,张璐娟.阿魏酸钠对肺源性心脏病患者内皮细胞及氧化应激的影响[J].长冶医学院学报,2012,26(1):22-25.

- [2] Chitra L,Boopathy R. Altered mitochondrial biogenesis and its fusion gene expression is involved in the high-altitude adaptation of rat lung[J]. *Respir physiol Neurobiol*, 2014;74-84.
- [3] 皮明山,吴钰祥.常见毒品对大脑神经元损伤的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*,2014,9(1):63-67.
- [4] Klahr S,Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. *Am Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(5): F861-875.
- [5] Cho HY,Reddy SP,Debiase A, et al. Gene expression profiling of NRF2 mediated protection against oxidative injury[J]. *Free Radic Biol Med*,2005,38(3):325-343.
- [6] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47:89-116.
- [7] Li YJ,Takizawa H, Azuma A, et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice[J]. *Clin Immunol*,2008,128(3):366-373.
- [8] Yoon HY,Kang NI, Lee HK, et al. Sulforaphane protects kidneys against ischemia reperfusion injury through induction of the Nrf2 dependent phase 2 enzyme[J]. *Biochem Pharmacol*,2008,75(11):2214-2223.
- [9] Park HM,Cho JM, Lee HR, et al. Renal protection by 3H 1,2 dithiole 3 thione against cisplatin through the Nrf2 antioxidant pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(5):597-607.
- [10] 王海英,杨义辉,喻田,等. Nrf2-ARE 通路在缺血后处理和吡那地尔后处理减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*,2012,32(4):481-484.
- [11] 鲍兵,陈志颖,殷小平. Keap1-Nrf2-ARE 通路及脑缺血[J]. *国际脑血管病杂志*,2012,2(7):547-550.
- [12] Hwang YP,Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme Oxygenase 1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine derived oxidative stress[J]. *FEBS Lett*, 2008,582(17):2655-2662.
- [13] Gao Y,Zhang HW, Qao HL. Protective effect of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on hydrogen peroxide-induced damage in PCI2 cells[J]. *Brain Res*,2010(1358): 239-247.

(收稿日期:2016-10-18 修回日期:2016-11-16)

欢迎投稿 欢迎订阅