

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.07.005

染料木素对尿毒症大鼠细胞外基质沉积的影响

王浩¹,冯冰^{1△},朱超¹,于建平²,黄宝砖³(1.解放军第四一医院肾内科,上海 200081;2.第二军医大学长海医院肾内科,上海 200433;
3.上海市徐汇区中心医院肾内科 200031)

[摘要] **目的** 探讨染料木素对尿毒症大鼠细胞外基质(ECM)沉积的影响及其机制。**方法** 5/6 肾切除术建立尿毒症模型鼠,将模型鼠分为染料木素组(G组)和对照组(C组),假手术组(S组)作为正常对照。检测各组术前及术后第 4、8 周尿蛋白和生化等指标,第 8 周观察肾组织病理变化情况,半定量法评估肾小球硬化指数(GSI)。免疫组化法检测Ⅳ型胶原(ColⅣ)、纤维连接蛋白(FN)的沉积情况。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法、Western blot 法分别检测肾组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) mRNA 转录、蛋白质表达情况。**结果** 术后第 4 周与 C 组比较,G 组尿蛋白排泄量减少[(11.63±2.07) vs. (19.93±3.19)mg/d, $P<0.01$],血清尿素氮、肌酐水平降低[(9.39±0.59) vs. (12.09±0.78)mmol/L,(65.11±3.79) vs. (77.63±3.20) μ mol/L, $P<0.01$]。至术后第 8 周,尿蛋白排泄量减少,血清尿素氮、肌酐水平降低更为显著。肾小球内 ColⅣ和 FN 沉积减少[(17.30±1.96)% vs. (24.68±3.97)%,(18.26±2.31)% vs. (29.35±4.15)%, $P<0.01$],肾小球硬化明显减轻。TGF- β_1 mRNA、蛋白质表达减弱($P<0.05$)。**结论** 染料木素可以减少尿毒症大鼠细胞 ECM 的蓄积,对肾脏具有保护作用。

[关键词] 染料木素;尿毒症;大鼠,Sprague-Dawley;胶原Ⅳ型;纤维连接蛋白;转化生长因子 β_1 **[中图分类号]** R459.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)07-0879-04

Effect of genistein on deposition of extracellular matrix in uremic rats

Wang Hao¹,Feng Bing^{1△},Zhu Chao¹,Yu Jianping²,Huang Baozhu³(1. Department of Nephrology, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China; 2. Department of Nephrology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;
3. Department of Nephrology, Xuhui District Central Hospital, Shanghai 200031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of genistein on deposition of extracellular matrix(ECM) in uremic rats and its mechanism. **Methods** The uremic rat model was established by 5/6 nephrectomy. The model rats were divided into the genistein group(G) and control group (C). The sham-operation group served as the normal control(S). Urinary protein and biochemical indexes before operation, at postoperative 4, 8 weeks were measured in various groups. The pathologic changes of renal tissue were observed. The glomerular sclerosis index(GSI) was evaluated by the semi-quantitative method. fibronectin(FN) and type Ⅳ collagen (ColⅣ) deposition situation were detected by using the immunohistochemical method. Western blot and RT-PCR were used to measure the protein expression and mRNA transcription of TGF- β_1 . **Results** Comparing postoperative 4 weeks with the group C, the urinary protein excretion amount was decreased[(11.63±2.07)mg/d vs. (19.93±3.19)mg/d, all $P<0.01$], serum urea nitrogen and creatinine levels of the group G were decreased[(9.39±0.59)mmol/L vs. (12.09±0.78)mmol/L, (65.11±3.79)mmol/L vs. (77.63±3.20) μ mol/L, all $P<0.01$]. Until postoperative 8 weeks, the urinary protein excretion amount was decreased and the decrease of serum urea nitrogen and creatinine levels was more obvious. The deposition of ColⅣ and FN in renal glomerulus was lower than that of the control group[(17.30±1.96)% vs. (24.68±3.97)%; (18.26±2.31)% vs. (29.35±4.15)%, all $P<0.01$]. Glomerular sclerosis was significantly alleviated. The TGF- β_1 mRNA and protein expression were attenuated ($P<0.05$). **Conclusion** Genistein can reduce the deposition of ECM in uremic rats and has a protective effect on kidney.

[Key words] genistein; uremia; rats, Sprague-Dawley; collagen type Ⅳ; fibronectin; transforming growth factor beta1

大豆为豆科植物大豆的成熟种子,我国最早的本草著作《神农本草经》首次记载了大豆及其药用价值,并将其列为中品。大豆异黄酮(soybean isoflavone)是存在于大豆中的生物活性物质,主要包括染料木素(genistein)、大豆甾元(daidzein)、大豆昔元(glycitein)等。有研究证实,大豆蛋白饮食可以减轻肾小球纤维化、降低蛋白尿、减轻肾小管萎缩^[1-3]。国内亦有研究发现,大豆蛋白饮食可以减轻尿毒症大鼠的早期血管病变,对肾脏具有一定的保护作用^[4]。目前有关大豆蛋白几种活性成分的研究主要集中在细胞与分子水平上,动物实验研究相对较少。本研究以 5/6 肾切除建立尿毒症大鼠模型,观察染料木素对肾硬化鼠细胞外基质(ECM)的作用情况。

1 材料与方

1.1 材料 (1)实验动物:雌性 6 周龄清洁级 SD 大鼠[动物许可证号 SCXK-(沪)2007-0003] 25 只,体质量 200~230 g,饲养于第二军医大学药学院清洁级动物房(合格证号:医动字第 02-64 号)。温度 20~23 ℃,相对湿度 40%~50%,光照 12 h 明暗交替,标准饲料饲养,自由饮水。(2)主要试剂:染料木素(批号:G6649-70)、兔抗大鼠Ⅳ型胶原(ColⅣ)、兔抗大鼠纤维连接蛋白(FN)抗体购于 Sigma 公司,小鼠抗大鼠转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 抗体、羊抗小鼠二抗购于 DAKO 公司, ECL 试剂盒购于 Pierce 公司,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂购于 Promega 公司。(3)主要仪器:SYNCHRON CX5 全自动

生化分析仪购于 Beckman 公司, Thermal Cycler 480 PCR 仪购于 Perkin Elmer 公司, HPIAS-1000 型医学图像分析系统购于千屏影像工程公司, GDS 7500 凝胶成像分析系统购于美国 UVI 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 使用数字表法, 随机将 25 只大鼠分为 3 组: 假手术组(S 组)8 只, 对照组(C 组)8 只, 染料木素组(G 组)9 只。

1.2.2 尿毒症模型鼠的建立及饲养方案 C、G 组大鼠采用间隔 1 周的两步法建立 5/6 肾切除尿毒症模型鼠^[5], 1 期手术在麻醉下扇形切除左肾上下极各 1/3, 吸收性明胶海绵止血; 术后第 8 天行 2 期手术摘除右肾。S 组麻醉下仅打开左、右肾包膜, 不切除肾脏。术后各组正常饮食喂养 8 周, G 组于 2 期手术后次日给予染料木素 15 mg/(kg·d)灌胃; C 组予等量的生理盐水灌胃。

1.2.3 尿蛋白及血生化检测 术前及术后第 4、8 周各组大鼠禁饮 1 d, 于代谢笼中收集 24 h 尿液, 使用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定尿蛋白量。于同样的时间点, 各组大鼠禁食 12 h 后经内眦静脉取血, 检测血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、血清清蛋白(Alb)和血清总蛋白(TP)。

1.2.4 肾组织病理检查 2 期手术后第 8 周采血检测 Scr 和 BUN, 确认尿毒症模型成功建立后即处死大鼠。手术摘取残肾, 固定、包埋、切片, 行 HE 染色。在光镜下观察各组肾小球病理情况。Raij 半定量法^[6]评估肾小球硬化指数(GSI)。肾小球出现玻璃样变和(或)毛细血管塌陷则定义为硬化。根据硬化灶所占肾小球比例分为 0~++++: 肾小球无硬化为 0; 受损 0~<25% 为 +; 受损 25%~<50% 为 ++; 受损 50%~<75% 为 +++; 受损 75%~100% 为 ++++。每张切片观察 30 个以上的肾小球, 计算 GSI。

1.2.5 免疫组织化学检测 应用 SABC 法测定残肾组织中的 Col IV 和 FN。肾组织切片、脱蜡, PBS 冲洗 3 min, 3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶 30 min, 微波加热后行抗原修复, PBS 冲洗 5 min, 分别加入一抗、二抗, DAB 显色, 光镜下棕黄色的颗粒为阳性显示。各鼠随机选取 10 个肾小球, 应用 HPIAS-1000 型医学图像分析系统计算图像中阳性区域与全区域的面积比。

1.2.6 RT-PCR 法检测 TGF-β1 mRNA 表达 取肾皮质 30~50 mg, Trizol 法抽提总 RNA, 逆转录合成 cDNA。TGF-β1 引

物序列上游: 5'-CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTG A-3', 下游: 5'-CCT CGT CAA CAG GTT GTA CTA GCA C-3', 扩增产物大小为 298 bp; GAPDH 引物序列上游: 5'-TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG-3', 下游: 5'-GTG GCA GTG ATG GCA TGG ATC-3', 扩增产物大小为 443 bp。PCR 扩增条件: 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 共 40 个循环, 72 °C 再延伸 10 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, GDS 7500 分析系统进行定量分析。

1.2.7 Western blot 印迹分析 取 30~50 mg 肾皮质碾碎, 加入 0.5 mL 含 PMSF 的细胞裂解液, 置冰上超声细胞粉碎。5 000 r/min, 0 °C 离心后取上清液。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离, 分离后电转移至硝酸纤维素膜, 置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。将 NC 膜放入小鼠抗大鼠 TGF-β1 稀释液中孵育 16 h, 漂洗。加入羊抗小鼠 IgG 中孵育 2 h。利用 ECL 试剂盒对产物进行检测。GDS 7500 分析系统检测各条带的光密度。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著差法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠尿蛋白水平及血生化指标比较 手术后第 4 周, C 组大鼠尿蛋白及 Scr、Bun 水平均升高, 第 8 周时明显升高。与 C 组比较, S、G 组尿蛋白排泄量明显减少($P < 0.01$), Scr、Bun 水平均显著下降($P < 0.01$)。实验期间各组大鼠血清 Alb 及 TP 水平比较均差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

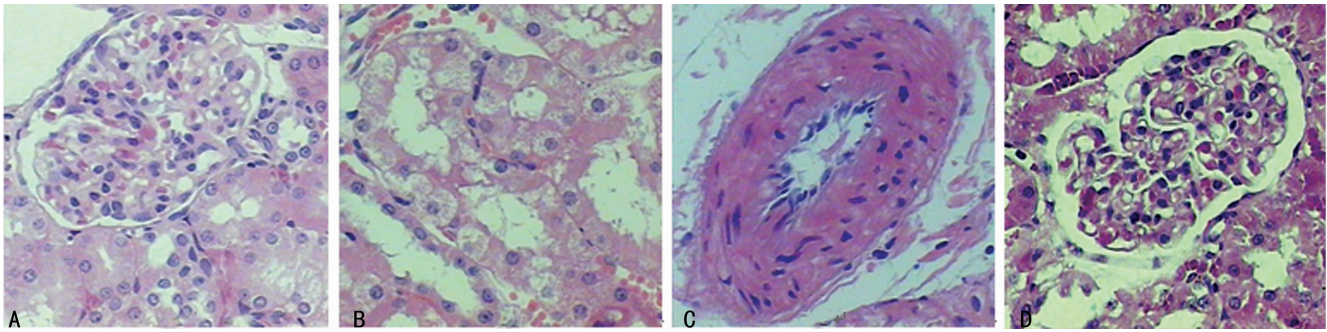
2.2 各组大鼠肾脏病理检查比较 在光镜下, S 组(图 1A)肾小球结构清晰, 无系膜增生、细胞增殖; C 组(图 1B、C)肾小球肥大、结构紊乱, 呈局灶纤维化或弥漫性球性硬化, 血管襻内皮细胞增殖, 肾间质可见炎细胞浸润, 动脉管腔轻度狭窄; G 组(图 1D)肾小球肥大不明显, 细胞增殖、系膜区增宽亦不及 C 组显著。S、C、G 组大鼠 GSI 分别为 3.34 ± 2.62 、 42.38 ± 14.31 、 27.65 ± 7.23 。与 C 组比较, G 组大鼠 GSI 明显降低($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肾脏组织 FN 和 Col IV 表达水平比较 结果表明, S 组肾小球系膜区有少量的 Col IV 和 FN 沉积。C 组 Col IV 和 FN 沉积明显增加($P < 0.01$)。与 C 组相比, G 组 Col IV 和 FN 沉积明显减少($P < 0.01$), 见图 2、表 2。

表 1 不同时间点各组大鼠尿蛋白量及生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

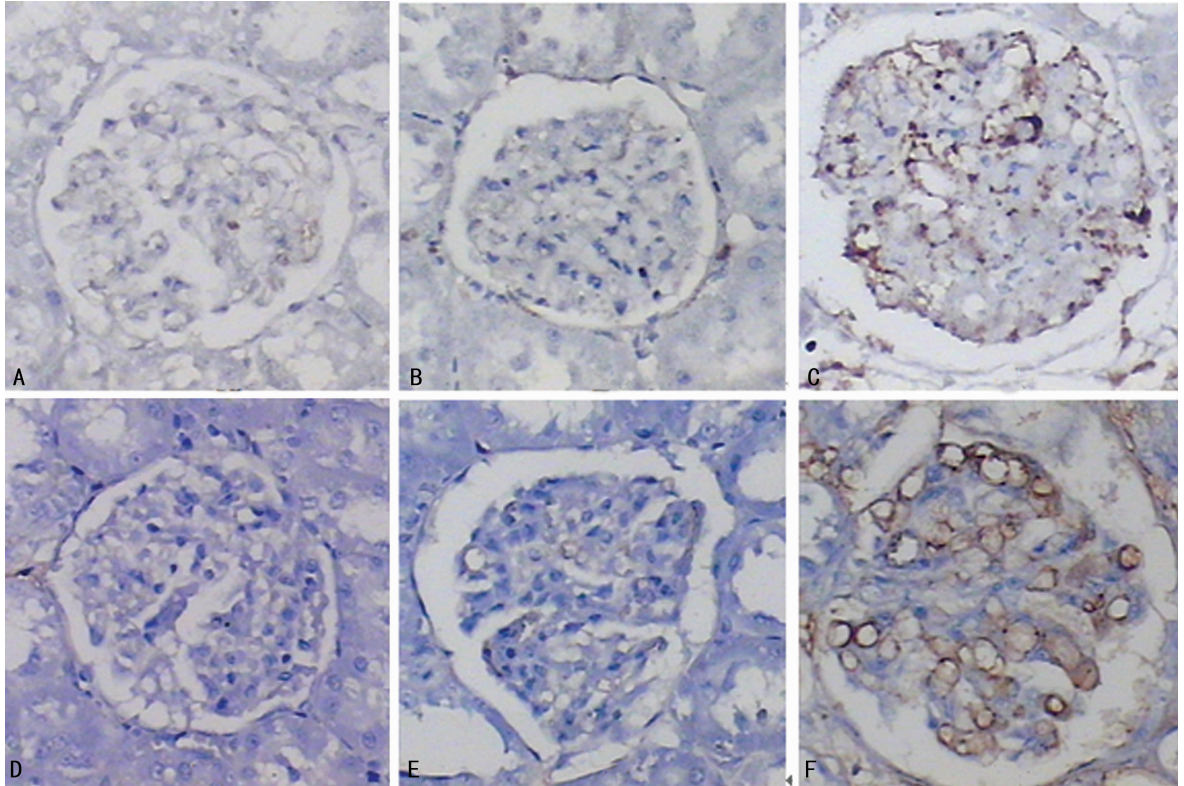
| 组别 | 尿蛋白(mg/d) | Scr(μ mol/L) | Bun(mmol/L) | Alb(g/L) | TP(g/L) |
|--------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|------------|------------|
| S 组($n=8$) | | | | | |
| 0 周 | 5.29±0.50 | 56.25±3.28 | 7.14±0.52 | 32.38±1.69 | 70.25±2.60 |
| 4 周 | 5.58±0.51 | 57.50±2.88 | 6.78±0.34 | 32.75±1.83 | 71.75±3.01 |
| 8 周 | 5.90±0.54 | 58.62±3.50 | 7.30±0.40 | 31.25±1.04 | 72.75±1.67 |
| C 组($n=8$) | | | | | |
| 0 周 | 5.18±0.58 | 56.13±3.40 | 6.98±0.46 | 30.38±1.41 | 69.88±2.23 |
| 4 周 | 19.93±3.19 ^a | 77.63±3.20 ^a | 12.09±0.78 ^a | 31.75±1.91 | 70.63±2.77 |
| 8 周 | 31.28±3.78 ^a | 90.25±2.71 ^a | 14.26±0.71 ^a | 33.38±1.69 | 69.88±1.55 |
| G 组($n=9$) | | | | | |
| 0 周 | 5.11±0.53 | 57.20±3.99 | 7.34±0.59 | 32.00±1.83 | 71.10±2.81 |
| 4 周 | 4.89±0.51 ^{ab} | 56.11±3.62 ^b | 7.34±0.59 ^{ab} | 31.11±1.90 | 70.78±2.44 |
| 8 周 | 11.63±2.07 ^{ab} | 65.11±3.75 ^{ab} | 7.39±0.59 ^{ab} | 30.61±1.80 | 69.11±2.47 |

^a: $P < 0.01$, 与 S 组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 C 组同期比较。



A: S 组; B, C: C 组; D: G 组。

图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色 (HE×200)



A: S 组 FN 表达; B: G 组 FN 表达; C: C 组 FN 表达; D: S 组 Col IV 表达; E: G 组 Col IV 表达; F: C 组 Col IV 表达。

图 2 各组大鼠肾组织 FN 和 Col IV 表达 (HE×200)

表 2 各组大鼠 FN 和 Col IV 沉积情况比较 (x̄±s, %)

| 组别 | n | FN | Col IV |
|-----|---|--------------------------|--------------------------|
| S 组 | 8 | 2.53±0.72 | 2.18±0.64 |
| C 组 | 8 | 29.35±4.15 ^a | 24.68±3.97 ^a |
| G 组 | 9 | 18.26±2.31 ^{ab} | 17.30±1.96 ^{ab} |

^a: P<0.01, 与 S 组比较; ^b: P<0.01, 与 C 组比较。

2.4 各组大鼠肾脏组织 TGF-β₁ mRNA 及蛋白表达比较 C 组肾组织 TGF-β₁ mRNA 及蛋白表达较 S 组升高 (P<0.05), G 组肾组织 TGF-β₁ mRNA 及蛋白表达较 C 组降低 (P<0.05), 见图 3、4 及表 3。

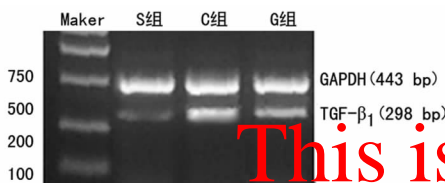


图 3 各组大鼠肾脏组织 TGF-β₁ mRNA 表达

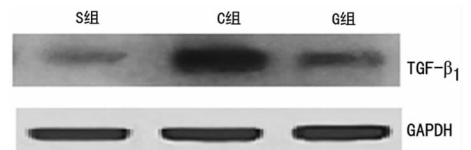


图 4 各组大鼠肾脏组织 TGF-β₁ 蛋白表达

表 3 各组大鼠肾脏组织 TGF-β₁ mRNA 和蛋白表达比较 (x̄±s)

| 组别 | n | TGF-β ₁ mRNA | TGF-β ₁ 蛋白 |
|-----|---|--------------------------|--------------------------|
| S 组 | 8 | 0.132±0.032 | 0.127±0.037 |
| C 组 | 8 | 0.644±0.079 ^a | 1.405±0.131 ^a |
| G 组 | 9 | 0.329±0.055 ^b | 0.432±0.076 ^b |

^a: P<0.05, 与 S 组比较; ^b: P<0.05, 与 C 组比较。

3 讨论

慢性肾脏病的临床治疗由来已久,但是关于是否可以食用大豆蛋白的争议一直困扰着临床医生和患者。传统观念认为大豆蛋白由于非必需氨基酸的存在,加重了肾脏的负担,

可能不利于甚至加重肾病患者的病情。但近年来,越来越多的研究表明,大豆蛋白饮食可以减轻多种肾病的肾脏损害。Javanbakht 等^[7]通过对肾病综合征鼠模型的研究发现,大豆蛋白可以改善肾组织氧化应激、减轻肾实质损害。Ibrahim 等^[8]发现,大豆蛋白可以降低多囊模型鼠的蛋白尿、改善酸中毒、减轻肾硬化。Yang 等^[9]研究证实大豆蛋白可以降低 5/6 肾次全切大鼠残余肾组织 TNF- α 水平、抑制血管紧张素转化酶(ACE)活性、减缓肾衰竭。而作为大豆蛋白单独的一种活性成分,染料木素也已被证实可以减少糖尿病模型鼠的蛋白尿、降低 SCr 和 BUN、改善脂质堆积^[10],对肾脏具有保护作用。

本实验以 5/6 肾切除建立尿毒症鼠模型,观察染料木素对 ECM 的作用情况。研究发现,在实验的第 4 周,C 组尿 SCr、BUN 升高,尿蛋白排泄量增加;第 8 周时,SCr、BUN 升高更为明显。G 组前述指标在第 4 和第 8 周时均明显低于 C 组,残肾组织病理改变亦明显减轻。结果表明染料木素可以减轻尿毒症鼠的肾损伤。全段实验过程中,各组间血清 Alb 及 TP 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),分析其原因可能是虽然尿蛋白排泄量增加,但肝脏尚能代偿,故血清 Alb 及 TP 水平没有明显降低。

ECM 主要由 ColIV、FN、Col I、Col V 型和层粘连蛋白等组成。ColIV 为基底膜胶原蛋白,主要分布于肾小球、肾小管基底膜以及系膜基质之中。FN 是一种糖蛋白,由肾小球固有细胞分泌。目前普遍认为,ECM 动态平衡的失调介导了肾小球硬化的发生、发展。特别是 ColIV 和 FN,其代谢失衡过程可能参与了肾小球损伤及修复过程中的组织重塑^[11]。现已认识到,肾脏正常组织的逐渐纤维化是大多数慢性肾衰竭进行性发展的共同病理基础。如能有效地阻止或减缓肾组织纤维化的发展,对延缓或改善慢性肾衰具有非常重要的意义。在本实验中,G 组与 C 组相比,ColIV 和 FN 在基底膜和系膜区的沉积明显减少。表明染料木素可以减少尿毒症鼠 ECM 的蓄积,减缓肾小球硬化。

TGF- β_1 是一类超家族细胞因子,作用广泛,参与了体内诸如炎症、血管形成、组织发生、增生、凋亡等多种生物学过程^[12-13],尤其是在 ECM 的产生和调控方面意义重大。Meng 等^[14]认为,正常或仅有微小病变的肾脏中,TGF- β_1 表达非常微弱。当出现肾损害时,TGF- β_1 表达明显增强。通过抑制 TGF- β_1 表达,可以减轻肾脏纤维化、维护正常的肾脏功能、保护残余肾功能^[15]。本实验中,G 组 TGF- β_1 在 mRNA、蛋白质水平上与 C 组比较均明显减弱,提示 TGF- β_1 的过度表达可能参与了肾组织间质纤维化的过程,并最终导致慢性肾衰竭。而染料木素对 TGF- β_1 的表达有抑制作用,该结果与尿蛋白排泄量、血生化、肾组织病理学改变、ColIV 和 FN 的沉积情况等相一致。

综上所述,染料木素可以降低 ColIV、FN 等 ECM 的蓄积、减轻肾小球硬化,对尿毒症鼠具有一定的肾脏保护作用,其机制可能与下调 TGF- β_1 表达有关。

参考文献

- Javanbakht MH, Sadria R, Djalali M, et al. Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome[J]. *Nefrologia*, 2014, 34(4): 483-490.
- Maditz KH, Gigliotti JC, Tou JC. Evidence for a role of

proteins, lipids, and phytochemicals in the prevention of polycystic kidney disease progression and severity[J]. *Nutr Rev*, 2013, 71(12): 802-814.

- Miraghajani MS, Esmailzadeh A, Najafabadi MM, et al. Soy milk consumption, inflammation, coagulation, and oxidative stress among type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(10): 1981-1985.
- 张志强, 袁伟杰, 叶菡洋, 等. 大豆蛋白饮食对 5/6 肾切除大鼠血管早期病变的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23(8): 529-533.
- Kennedy DJ, Elkareh J, Shidyak A, et al. Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(2): 450-454.
- Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats[J]. *Kidney Int*, 1984, 26(2): 137-143.
- Javanbakht MH, Sadria R, Djalali M, et al. Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome[J]. *Nefrologia*, 2014, 34(4): 483-490.
- Ibrahim NH, Jia Y, Devassy JG, et al. Renal cyclooxygenase and lipoxygenase products are altered in polycystic kidneys and by dietary soy protein and fish oil treatment in the Han:SPRD-Cy rat[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(4): 768-781.
- Yang HY, Chen JR, Chang LS. Effects of soy protein hydrolysate on blood pressure and angiotensin-converting enzyme activity in rats with chronic renal failure[J]. *Hypertens Res*, 2008, 31(5): 957-963.
- Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, et al. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Vascul Pharmacol*, 2011, 55(5/6): 149-156.
- Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, et al. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2014, 7(1): 4-9.
- Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis[J]. *Redox Biol*, 2015, 12(6): 565-577.
- Docherty NG, Murphy M, Martin F, et al. Targeting cellular drivers and counter-regulators of hyperglycaemia and TGF- β 1-associated profibrotic responses in diabetic kidney disease[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(9): 1154-1162.
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- Muñoz-Félix JM, González-Núñez M, Martínez-Salgado C, et al. TGF- β /BMP proteins as therapeutic targets in renal fibrosis. Where have we arrived after 25 years of trials and tribulations[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 12(156): 44-58.