

火绒草对系膜增生性肾小球肾炎炎症反应的影响

赵 玥, 王光函, 张 颖, 姜 鸿, 齐 越*
(辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 目的 探究火绒草对系膜增生性肾小球肾炎炎症反应的影响。方法 采用大鼠 MsPGN 模型, 随机分成假手术组、模型组、火绒草水提物高 (2.70 g/kg)、中 (1.35 g/kg)、低 (0.68 g/kg) 剂量组、中药阳性对照组 (雷公藤多苷组, 20 mg/kg) 和西药阳性对照组 (盐酸贝那普利片组, 40 mg/kg)。观察肾脏病理变化, 测定模型大鼠血清肌酐、尿素氮水平, 以及血清中 TNF- α 、IL-6 水平, 并检测肾脏组织中 NF- κ B、I κ B、PI3K、Akt 蛋白表达。结果 火绒草提取物高剂量组可显著降低血清肌酐水平, 并且高、中、低剂量组均可降低血清尿素氮水平; 高、中剂量组可降低血清中 TNF- α 水平, 并且高剂量组可降低血清中 IL-6 水平; 高、中剂量组可降低 NF- κ B、磷酸化 PI3K、磷酸化 AKT 蛋白表达, 并且可升高 I κ B 蛋白表达。病理形态学观察显示, 火绒草高剂量组肾组织损伤有一定改善。结论 火绒草可能通过影响 NF- κ B、PI3K/Akt 信号分子的活化, 抑制了炎症因子的释放、系膜细胞的增殖以及细胞外基质的增生, 发挥肾脏保护作用。

关键词: 火绒草; 系膜增生性肾小球肾炎; 血清肌酐; 尿素氮

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)04-1033-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.039

火绒草 *Leontopodium leontopodioides* (Willd.) Beauv. 为菊科火绒草属植物火绒草, 具有清热凉血、益肾利水的功效^[1]。现代医学表明, 火绒草具有抗炎、抗氧化等多种药理活性^[2-3], 民间主要用于治疗流行性感、急(慢)性肾炎、蛋白尿血尿等疾病^[4]。系膜增生性肾小球肾炎 (Mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 为慢性肾小球肾炎, 以蛋白尿、血尿、水肿等为主要临床表现^[5]。其发病机制复杂, 炎症细胞浸润等多种因素相互作用都可影响 MsPGN 疾病的发生和发展^[6]。曾有报道研究火绒草对系膜增生性肾小球肾炎的治疗作用^[7], 但基础研究较少, 相关的作用机制及调控的靶点也未明确, 因此考察火绒草治疗肾炎的作用机制具有重要意义。根据中药多成分、多途径、多靶点的特点, 本研究通过对 MsPGN 大鼠模型血清炎症因子的测定以及肾脏组织中蛋白表达的检测, 探索火绒草对 MsPGN 疾病的治疗作用及调控机制, 为火绒草的临床应用及抗炎制剂的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 SD 雄性大鼠 75 只, 体质量 180~220 g (辽宁长生生物技术有限公司), 实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2015-0001。

1.2 试剂 牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂 (德国 Sigma 公司, 批号 WX-BC7359V、SLBV6895、SLBT5128); 白介素 6 (interleukin

6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α) 大鼠酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号 m1064292、m1002859); 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺上样缓冲液 (SDS-PAGE loading Buffer) (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 01411/40342); 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA); 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 P0012); 核因子- κ B p65 (nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B)、磷酸化蛋白激酶 B (p-protein kinase B, P-AKT) (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号 82427T、4060T); 蛋白激酶 B 1/2/3 (protein kinase B 1/2/3, AKT1/2/3)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) (英国 Abcam 公司, 批号 GR242901-30、GR3245955-1), 上述抗体稀释 1 000 倍使用; 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 (p-phosphatidylinositol 3 kinase, P-PI3K)、肌动蛋白 (β -Actin) (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 AH08106421、AH01032107), 稀释 400 倍使用。

1.3 药物 火绒草药材 (野生, 采于辽宁沈阳祝家镇, 160601, 由辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为正品)。雷公藤多苷片 (上海复旦复华药业有限公司, 批号 171201); 盐酸贝那普利片 (北京诺华制药有限公司, 批号 X2657)。

1.4 仪器 恒温培养箱 (厦门医疗电子仪器厂); 离心机 (美国 Thmorgan 公司); 组织研磨机 (CK1000D, 上海力申

收稿日期: 2019-08-08

基金项目: 中西医结合学科项目 (10010239A00036)

作者简介: 赵 玥 (1984—), 女, 博士生, 副研究员, 从事中药资源与质量控制研究。Tel: (024) 86803184, E-mail: z.yue2008@163.com

* 通信作者: 齐 越 (1977—), 女, 研究员, 研究方向为神经药理学。Tel: (024) 86803005, E-mail: lnzyxyqy2003@163.com

科学仪器有限公司); 酶标仪 (Neofuge 13R, 美国伯腾仪器公司); ELx800 酸度计 (PHS-25C, 上海康仪仪器有限公司); 垂直电泳槽湿转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 火绒草提取物的制备 取火绒草药材 150 g, 加入 10 倍量水, 回流提取 2 h, 滤过, 残余药渣加入 8 倍量水, 提取 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 备用。

2.2 MsPGN 模型的建立^[7] 所有 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 按体质量随机选取 10 只作为空白组, 其余 65 只用于建立 MsPGN 模型。取各组大鼠称定质量, 10% 水合氯醛腹腔注射 (300 mg/kg) 麻醉, 进行左侧肾脏切除手术。将麻醉后大鼠放置于无菌操作台上, 固定、备皮, 手术部位涂抹碘伏、75% 乙醇进行消毒, 沿左肋脊角入口剪开, 暴露肾脏, 用手术线快速结扎左侧肾脏动、静脉和输尿管, 剪下左侧肾脏, 用青霉素钠处理结扎处, 缝合伤口并消毒, 涂抹火棉胶。手术一周后, 除空白组外, 其余大鼠均皮下注射 0.1 mL A 液 (弗氏完全佐剂+3.0 mg BSA), 于第 1 周末、第 2 周末大鼠皮下注射 0.1 mL B 液 (弗氏不完全佐剂+3.0 mg BSA); 于第 3 周末, 大鼠腹腔注射 BSA, 连续 4 次, 间隔 1 h, 剂量分别为每只 0.5、1.0、1.5、3.0 mg。次日大鼠腹腔注射 2.0 mg BSA。于第 4 周起大鼠每日腹腔注射 BSA, 开始剂量为 0.5 mg, 每日增加 0.5 mg, 直至 5.0 mg, 继续每周加量 1 mg 至 10 mg 为止。于第 5 周末大鼠尾静脉注射脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 100 μg。空白组大鼠麻醉后手术暴露左侧肾脏, 但不做切除, 其余步骤同造模组, 皮下、腹腔均注射生理盐水, 称为假手术组。除麻醉意外死亡 2 只, 剩余大鼠造模结束后收集大鼠 24 h 尿液做尿常规检查, 将尿蛋白检测为阴性的 3 只大鼠剔除, 剩余大鼠分为模型组, 中药阳性药组 (雷公藤多苷片 20 mg/kg), 西药阳性药组 (盐酸贝那普利片 40 mg/kg), 火绒草高、中、低剂量组 (2.70、1.35、0.68 g/kg), 每组 10 只。各组模型大鼠在次日开始连续灌胃给药 15 mL/kg, 每日给药 1 次, 给药时间为 5 周, 假手术组与模型组均给

相同容量的水。

2.3 血清肌酐、血清尿素氮生化指标的测定 给药结束后, 所有大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉, 进行腹主动脉采血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, -80 °C 冻存, 按照试剂盒说明书进行血清肌酐、血清尿素氮的测定。

2.4 炎症指标的测定 取大鼠血清, 按照试剂盒说明书进行 IL-6、TNF-α 的测定。

2.5 肾脏组织病理学形态观察 大鼠腹主动脉取血后立刻解剖摘取右侧肾组织, 迅速沿冠状面将肾脏切为大致相等的两半, 其中一半投入 10% 中性福尔马林溶液中固定以备 HE 染色观察, 另一半置于液氮瓶中保存。

2.6 相关蛋白的检测 取液氮保存的肾脏组织, 采用 Western blot 法检测肾脏组织中核因子-κB (NF-κB)、阻遏蛋白 (IκB)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (AKT) 蛋白表达。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行单因素方差分析, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。首先对数据进行正态性检验, 符合正态分布的, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐则采用最小显著差法进行两两比较, 方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验进行两两比较; 若不符合正态分布, 则采用非参数检验进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 火绒草提取物对血清肌酐及血清尿素氮的影响 由表 1 可见, 与假手术组相比, 模型组中血清肌酐及血清尿素氮水平增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 火绒草提取物高剂量组可降低大鼠血清肌酐水平 ($P < 0.05$), 高、中、低剂量组可降低大鼠血清内尿素氮水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。雷公藤多苷组可降低血清肌酐及血清尿素氮水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 盐酸贝那普利片组可降低血清尿素氮水平 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 火绒草提取物对血清中血清肌酐及血清尿素氮水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	血清肌酐/(μmol·L ⁻¹)	血清尿素氮/(μmol·L ⁻¹)
假手术组	-	10	13.41±2.64	5.87±0.93
模型组	-	10	39.14±8.05 [#]	10.82±2.11 ^{##}
火绒草提取物高剂量组	2.70	10	28.98±7.48 [*]	7.28±1.22 ^{**}
火绒草提取物中剂量组	1.35	10	37.88±9.88	7.82±0.94 [*]
火绒草提取物低剂量组	0.68	10	38.74±12.16	8.34±0.78 [*]
雷公藤多苷组	20 mg/kg	10	25.83±7.92 [*]	6.28±2.59 ^{**}
盐酸贝那普利片组	40 mg/kg	10	32.92±10.82	7.59±2.63 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 火绒草提取物对 TNF-α、IL-6 的影响 由表 2 可见, 与假手术组相比, 模型组血清中 TNF-α、IL-6 水平增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 火绒草提取物高、中剂量组可降低血清中 TNF-α 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 火绒草提取物高剂量组可降低大鼠血清内的 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。雷公藤多苷组可降低 TNF-α、IL-6 水平 ($P <$

0.05)。见表 2。

3.3 火绒草对 MsPGN 模型大鼠 HE 染色形态学观察结果

由图 1 可见, 假手术组显微镜下可见该组大鼠肾小球结构无明显变化, 系膜细胞及胞外基质无明显增多, 无炎性细胞浸润。模型组可见该组大鼠肾小球明显肥大, 肾小球偶见萎缩, 系膜区细胞弥漫性增多、胞外基质增生, 肾间

表2 火绒草提取物对血清中 TNF- α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
假手术组	-	10	146.99±12.50	104.48±18.13
模型组	-	10	187.59±23.53 ^{##}	132.54±22.54 [#]
火绒草提取物高剂量组	2.70	10	152.75±9.10 ^{**}	109.84±8.35 [*]
火绒草提取物中剂量组	1.35	10	163.88±10.03 [*]	112.50±16.75
火绒草提取物低剂量组	0.68	10	185.91±16.03	122.17±21.40
雷公藤多苷组	20 mg/kg	10	165.10±14.20 [*]	113.67±10.43 [*]
盐酸贝那普利片组	40 mg/kg	10	179.50±5.06	120.66±13.20

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

质炎性细胞浸润,肾小管坏死。火绒草提取物高剂量组可见该组大鼠肾小球结构轻度变化,系膜细胞、基质轻度增生,系膜区无增宽,少有炎症细胞浸润。火绒草提取物中、低剂量组,可见该组大鼠肾小球结构改变,系膜细胞、基质轻度增生,有炎症细胞浸润。雷公藤多苷组可见该组大鼠肾小球肥大不明显,系膜细胞、基质轻度增生,炎症细胞浸润不明显。盐酸贝那普利片组可见该组大鼠肾小球及毛细血管壁无受损,系膜细胞轻度增生,胞外基质基本正常,炎症细胞浸润不明显。见图1。

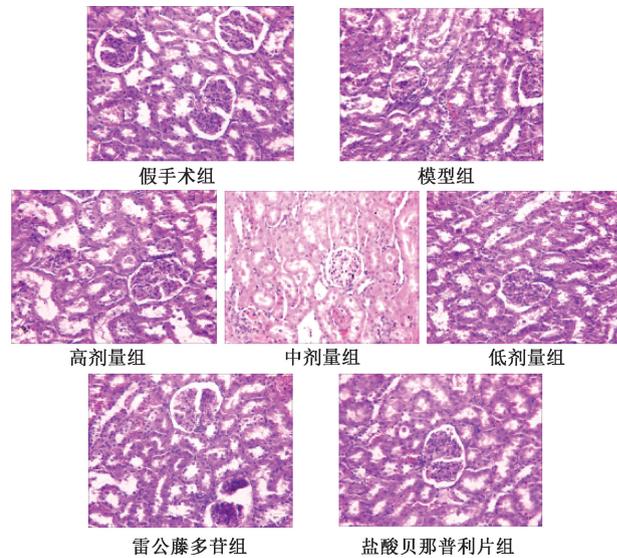


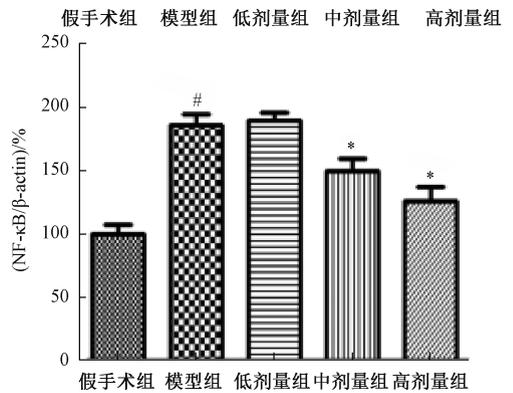
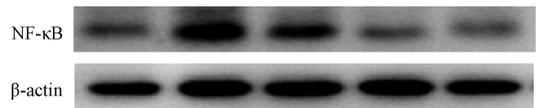
图1 肾脏组织 HE 染色

3.4 火绒草提取物对肾脏组织中 NF- κ B、I κ B、PI3K、AKT 蛋白表达的影响 由图2~5可见,与假手术组比较,模型组中 NF- κ B、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达升高 ($P<0.05$), I κ B 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与模型组比较,火绒草高、中剂量组中 NF- κ B、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达均降低 ($P<0.05$),高、中、低剂量组 I κ B 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)。

4 讨论

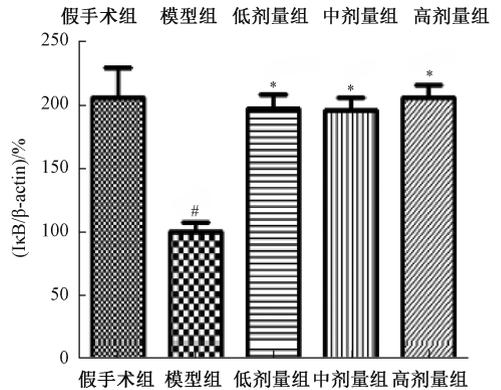
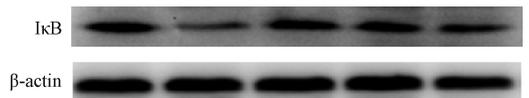
肾脏疾病临床检测指标主要为血清肌酐和尿素氮,此项指标是了解肾功能的主要方法之一,血清肌酐和尿素氮升高意味着肾功能的损害。本实验中火绒草水提取物对大鼠 MsPGN 模型中血清肌酐及尿素氮量的影响可初步评价火绒草对 MsPGN 的治疗作用。

系膜增生性肾小球肾炎发生时,沉积于肾小球系膜区



注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

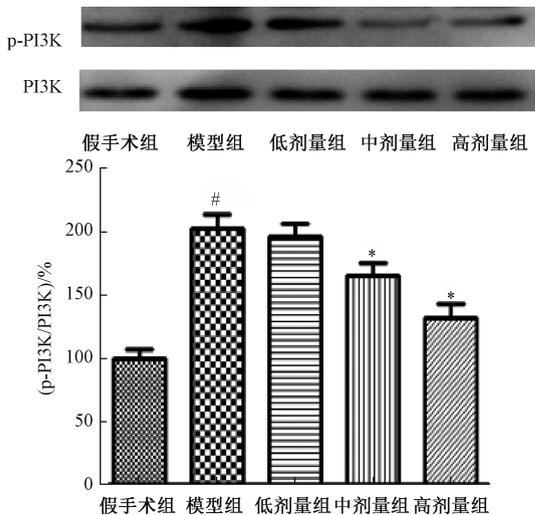
图2 火绒草水提取物对 NF- κ B 蛋白表达的影响 ($n=5$)



注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图3 火绒草水提取物对 I κ B 蛋白表达的影响 ($n=5$)

的难溶性循环免疫复合物发生炎症反应,产生 TNF- α 和 IL-6,它们与系膜细胞表面的受体结合,进一步加重了炎症反应,进而引起肾小球损伤。因此抑制 TNF- α 及 IL-6 的释放对系膜增生性肾小球肾炎疾病的发生发展至关重要^[8]。在本研究中,火绒草提取物可降低模型大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平,可推测火绒草通过抑制肾小球系膜区难溶性免疫复合物的沉积,减少了 TNF- α 和 IL-6 的释放。



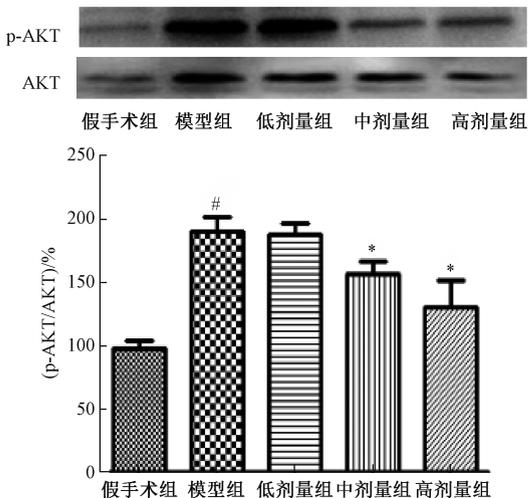
注：与假手术组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ 。
图4 火绒草水提物对 p-PI3K 蛋白表达的影响 ($n = 5$)

速 I κ B 的降解及磷酸化 p65 的 Ser529 和 Ser536 位点，增强已经结合在核内 NF- κ B 结合序列上的 NF- κ B 的转录活性，影响 NF- κ B 的核转位，进而影响系膜细胞的过度增殖。

本研究结果表明：模型组大鼠 I κ B 蛋白表达减少，NF- κ B 的蛋白表达增加，PI3K/AKT 磷酸化水平增加，提示在 MsPGN 模型大鼠肾脏中炎症 NF- κ B 信号转导通路和 PI3K/AKT 信号转导通路被激活。药物干预 5 周后，火绒草提取物可降低 NF- κ B 蛋白表达和 PI3K/AKT 磷酸化表达，增加 I κ B 蛋白水平，提示火绒草提取物可能通过影响 NF- κ B 信号分子以及 PI3K/AKT 信号分子的活化，进而抑制炎症因子的释放，从而缓解 MsPGN 模型大鼠的肾脏病理损害，起到保护肾脏作用。

参考文献：

- [1] 高松. 辽宁中药志 (植物类) [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010: 959-960.
- [2] Zhao Y, You X M, Jang H, et al. Spectrum-effect relationships between high-performance liquid chromatography fingerprints and anti-inflammatory activities of *Leontopodium leontopodioides* (Willd.) Beauv [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1104: 11-17.
- [3] 姜鸿, 邹桂欣, 王光函, 等. 基于 5-LOX 体外代谢途径的火绒草抗炎活性部位筛选 [J]. *亚太传统医药*, 2015, 11 (6): 36-38.
- [4] 赵玥, 齐越, 单国顺, 等. 不同产地火绒草 HPLC 指纹图谱的建立及化学模式识别 [J]. *中成药*, 2019, 41(4): 849-854.
- [5] 张小方, 赵影, 曹广海, 等. 丹参注射液治疗小儿系膜增生性肾炎的临床观察 [J]. *中成药*, 2017, 39(8): 1751-1753.
- [6] 林劲. 基于 PI3K/AKT 通路探讨白芍总苷对系膜增生性肾炎的干预作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [7] 徐珊, 赵明琦, 李增强, 等. 火绒草对大鼠系膜增生性肾小球肾炎的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4): 108-111.
- [8] Malutan A M, Druqan T, Costin N, et al. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2015, 40(1): 96-102.
- [9] 高亮, 任现志. 核转录因子- κ B 与系膜增生性肾炎的关系及中药调控机制探讨 [J]. *吉林中医药*, 2015, 35(1): 60-63.
- [10] 于力, 葛林. 肾小球足细胞自噬与 PI3K/AKT 信号通路的研究进展 [J]. *临床儿科杂志*, 2015, 33(6): 501-503.



注：与假手术组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ 。
图5 火绒草水提物对 p-Akt 蛋白表达的影响 ($n = 5$)

NF- κ B 可调控免疫应答和炎症反应的基因转录、细胞的增殖和凋亡等多种细胞活动，IL-6、TNF- α 等炎症因子是 NF- κ B 的靶标基因，因此活化的 NF- κ B 在炎症反应过程中起到重要的作用。研究发现，抑制系膜细胞内的 NF- κ B 的活性，可改善 MsPGN 中系膜细胞的功能异常^[9]。PI3K 是信号转导途径中重要的调控蛋白，AKT 是 PI3K 下游的磷酸化激酶，在细胞的生存和凋亡机制中起到重要的作用^[10]。PI3K/AKT 信号通路与 NF- κ B 信号通路相互作用，紧密相连。活化后的 AKT 可通过活化 I κ B 激酶 (IKK) 加