



淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病大鼠的作用及相关机制

张 红^{1*}, 刘 念², 李 征³

(郑州大学附属南阳市中心医院 1. 肾病风湿免疫科; 2. 骨二科; 3. 泌尿外科, 河南 南阳 473400)

【摘要】 目的 探究不同剂量的淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病大鼠的影响, 并研究其相关作用机制。**方法** 建立实验性 IgA 肾病大鼠模型, 实验共分为 5 组, 正常对照组 (con), 造模组 (IgA), 淫羊藿苷低剂量组 (ICA-L), 淫羊藿苷中剂量组 (ICA-M) 和淫羊藿苷高剂量组 (ICA-H); 各组经相应处理后, 测定各组大鼠尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平; 免疫荧光染色检测 IgA 沉淀情况; 免疫组化染色法与实时荧光定量 PCR 分别检测 NF- κ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达水平和 IL-4, IL-10 与 IL-13 的 mRNA 表达变化。**结果** 给予淫羊藿苷处理后, 降低实验性 IgA 肾病大鼠的尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平与减少 IgA 沉淀, 并降低 NF- κ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达水平和 IL-4, IL-10 与 IL-13 的 mRNA 表达。**结论** 淫羊藿苷对实验性 IgA 肾病有一定的疗效, 可能与调控 NF- κ Bp65, MCP-1 因子的表达以及机体免疫调节有关。

【关键词】 淫羊藿苷; IgA 肾病; NF- κ Bp65; MCP-1; IL-4; IL-10; IL-13

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0073-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 01. 015

Effects of Icaritin of experimental IgA nephropathy in rats

ZHANG Hong¹, LIU Nian², LI Zheng³

(1. Department of Nephropathy Rheumatology, 2. Department of Orthopaedics, 3. Department of Urology, Nanyang Central Hospital of Zhengzhou University, Nanyang 473400, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Icaritin (ICA) experimental IgA nephropathy in rats and to explore related mechanisms. **Methods** Experimental IgA nephropathy rat model was established and then model rat were treated with or without different doses of ICA. Then, urine RBC, Urine protein and urine NAG were analyzed; IgA precipitation was detected with immunofluorescence staining; the protein level of NF- κ Bp65 and MCP-1 were examined by immunohistochemical staining; the mRNA level of IL-4, IL-10 and IL-13 were determined by quantitative PCR. **Results** The concentrations of urine RBC, Urine protein and urine NAG were reduced after ICA treatment, as accompanied by a decrease of IgA precipitation. Moreover, ICA treatment also decreased the protein level of NF- κ Bp65 and MCP-1, and the mRNA level of IL-4, IL-10 and IL-13. **Conclusions** ICA exerts a certain degree of efficacy on the treatment of experimental IgA nephropathy through regulating NF- κ Bp65 and MCP-1 expression and the immunoregulation mechanism.

【Key words】 Icaritin; IgA nephropathy; NF- κ Bp65; MCP-1; IL-4; IL-10; IL-13

IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是最常见的原发性肾小球疾病之一, 主要表现为肾小球系膜区 IgA 沉积, 伴随膜细胞增生和系膜基质扩张^[1]。临

床病状表现多样, 主要有肾病综合征、高血压、急性肾炎与肾功能不全等, 既往认为 IgA 肾病患者的预后良好, 但仍有 25%~30% 的患者最终发展为终末

期肾病^[2]。IgA 肾病及导致得肾衰竭给患者造成严重的健康困扰及沉重的经济分担。因此,有效地预防及治疗 IgA 肾病是临床迫切需要解决的难题。

淫羊藿苷(Icariin, ICA)是小檗科淫羊藿属淫羊藿茎叶的主要活性成分之一。主要具有免疫调节,抗肿瘤,促进骨细胞发育和心血管系统等药理作用。吴东方等^[3]研究发现淫羊藿苷通过抑制肾皮脂质过氧化物的产生与减轻谷胱甘肽的消耗,从而降低肾损伤大鼠的血肌酐和尿素氮水平。另外,陈香美等^[4]研究发现淫羊藿苷能够增加 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,减轻庆大霉素对肾小管与肾间质的损伤。此外,研究表明淫羊藿苷还可增强血凝素,从而诱生 IL-2、IL-3 和 IL-6 的作用,与剂量呈正相关,通过促进 IL-2 的含量提高淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤细胞和 B 细胞的功能^[5]。随着淫羊藿苷的药理作用研究的不断深入,临床上疗效也显示出巨大的优势。我们通过建立 IgA 肾病大鼠模型,探讨不同剂量的淫羊藿苷对 IgA 肾病的作用,并研究其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 50 只,体重 180 ~ 200 g,雌雄各半,购自北京华阜康生物科技股份有限公司, [SCXK(京)2014-0009]。饲养于南阳理工学院中医学实验中心 SPF 级动物房,实验动物使用许可证号[SYXK(豫)2014-0006],相对湿度 45%~75%。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂

淫羊藿苷(Icariin)购自西安小草植物科技有限公司,纯度 >98%;牛血清白蛋白购自北京希凯创新科技有限公司;脂多糖购自 Sigma 公司, NF- κ Bp65 与 MCP-1 抗体购自博士德生物工程有限公司;IL-4, IL-10, IL-13 引物购自广州迈博生物科技有限公司;其他试剂购自国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模与分组

将健康 SD 大鼠进行 1 周的适应性喂养,造模方法按照汤颖等^[6]实验性 IgA 肾病模型进行,除正常对照组(control group)外,其余各组大鼠用 400 mg/kg 10% 牛血清白蛋白灌胃,每日一次,直至实验结

束,共 21 周;于第 6 周和第 8 周末尾静脉注射 0.05 mg 脂多糖,每只每次;每周末皮下注射蓖麻油 0.5 mL 与四氯化碳 0.1 mL,共给药 9 周;正常对照组在相应时间等体积给予蒸馏水灌胃,生理盐水皮下注射和尾静脉注射。于第 9 周末,心脏取血处死 4 只模型组大鼠,取肾脏组织做免疫荧光检查,其余大鼠随机分为造模组(IgA group),淫羊藿苷低剂量组(ICA-L group),淫羊藿苷中剂量组(ICA-M group)和淫羊藿苷高剂量组(ICA-H group),在第 9 周末开始,淫羊藿苷低剂量组,淫羊藿苷中剂量组和淫羊藿苷高剂量组分别灌胃 60 mg/kg, 90 mg/kg 和 120 mg/kg,每日一次,直至实验结束,共 12 周,试验中并无大鼠死亡。

1.3.2 尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平的测定

于 21 周末,将大鼠置于代谢笼中,饮食正常,收集 24 h 尿液,测量尿液中尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 的水平。

1.3.3 免疫荧光染色

处死大鼠后,摘除肾脏,用组织包埋剂 OCT 包埋后,置于 -80℃ 液氮中冷冻,切片,晾干, PBS 洗涤 3 次,滴入加 FITC 标记的 IgA 抗体(1:50),置于 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤,滴入甘油封片,置于荧光显微镜观察 IgA 的沉淀情况与绿色荧光的强度。

1.3.4 免疫组化染色

将大鼠肾组织制成石蜡切片,置于 80℃ 烘箱 60 min,分别浸泡于二甲苯 I、II 各 10 min,再置于梯度酒精(100%、95%、85%、75%)浸泡 5 min, PBS 冲洗,置于 3% H_2O_2 浸泡 8 min, PBS 冲洗,加入 8% 山羊血清封闭,孵育 10 min,滴入一抗,4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗,加入相应带生物素标记的二抗,37℃ 孵育 20 min,加入 DAB 显色剂,自来水冲洗,苏木素复染,1% 盐酸分化,碳酸锂溶液蓝化,梯度酒精脱水(75%、85%、95%、100%),二甲苯 I、II 透明,中性树脂封片,置于光学显微镜下观察。

1.3.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)

取各组大鼠肾脏组织,依据 Trizol 说明书要求,提取总 RNA,反转录合成 cDNA,采用 PCR 仪进行扩增,所用引物序列如表 1 所示。扩增条件:94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 73℃ 45 s,共 34 个循环,74℃ 延伸 5 min。实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比,目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
白细胞介素-4 IL-4	forward primer 5'-GCTAT-TGATGGGTCTCACCC-3' reverse primer 5'-CAGGACGTCAAGGTA-CAGGA-3'
白细胞介素-10 IL-10	forward primer 5'-AGGGCACCCAGTCTGAGAACA-3' reverse primer 5'-CGGCCTTGCTCTTGTTCAC-3'
白细胞介素-13 IL-13	forward primer 5'-CTCGCTTGCCTTGGTG-3' reverse primer 5'-TGATGTTGCTCAGCTCCTC-3'
β-肌动蛋白 β-actin	forward primer 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' reverse primer 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

表 2 尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.2 The change of urine erythrocyte, urinary protein and urinary NAG content

组别 Group	尿红细胞(per/ μ L) Urine erythrocyte	尿蛋白(mg/L) Urinary protein	尿 NAG(U/L) Urinary NAG
正常对照组 Control group	7.12 $\pm$ 3.57	8.53 $\pm$ 4.38	0.97 $\pm$ 0.47
造模组 IgA group	391.86 $\pm$ 13.94 ^a	62.18 $\pm$ 11.73 ^a	6.12 $\pm$ 1.64 ^a
淫羊藿苷低剂量组 ICA-L group	264.28 $\pm$ 18.57 ^{ab}	48.67 $\pm$ 8.34 ^{ab}	4.53 $\pm$ 1.57 ^{ab}
淫羊藿苷中剂量组 ICA-M group	173.62 $\pm$ 15.82 ^{ab}	32.46 $\pm$ 4.57 ^{ab}	2.83 $\pm$ 0.83 ^{ab}
淫羊藿苷高剂量组 ICA-H group	86.34 $\pm$ 9.34 ^{ab}	18.34 $\pm$ 2.37 ^{ab}	1.76 $\pm$ 0.37 ^{ab}

注:与正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与 IgA 组相比,^b $P < 0.05$ 。
Note. ^a $P < 0.05$ vs control group. ^b $P < 0.05$ vs IgA group.

1.4 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平

与 control 组相比,IgA 组大鼠的尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平均显著升高($P < 0.05$),给予淫羊藿苷干预后,随剂量增大尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平逐渐下降,如表 2 所示。

2.2 肾组织 IgA 免疫荧光检测结果

如图 1 所示,control 组不出现 IgA 沉淀;IgA 组大鼠肾小球系膜区出现弥漫性颗粒状沉淀,强阳性绿色荧光,呈弥漫性团块状;给予淫羊藿苷干预的大鼠肾组织沉淀较少,呈弱绿色荧光,并随剂量升高荧光强度减弱。

2.3 肾组织的 NF- κ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达水平

如图 2,3 所示,control 组肾组织中 NF- κ Bp65 与 MCP-1 蛋白少量表达;与 control 组相比,IgA 组中

NF- κ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达显著升高,呈强阳性表达;与 IgA 组相比,给予淫羊藿苷干预后,随剂量增大,NF- κ Bp65 与 MCP-1 的蛋白表达逐渐减弱。

2.4 肾组织中 IL-4, IL-10 与 IL-13 的 mRNA 表达变化

如图 4 所示,与 control 组相比,IgA 组中 IL-4, IL-10 和 IL-13 的 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$);与 IgA 组相比,给予淫羊藿苷干预后,随剂量增大,IL-4,IL-10 和 IL-13 的 mRNA 表达逐渐减弱。

3 讨论

本试验采用联合牛血清白蛋白 + 脂多糖 + 蓖麻油 + 四氯化碳方法进行造模,通过免疫荧光结果显示造模组大鼠肾小球系膜区出现弥漫性颗粒状沉淀,符合 IgA 肾病的病理变化,提示本试验 IgA 肾病大鼠造模成功。蛋白尿是 IgA 肾病患者最常出现的临床症状,蛋白尿是引起肾小管间质损害的因素之一,使肾小管细胞缺氧导致肾小管上皮细胞萎缩^[7]。本试验显示淫羊藿苷明显减轻 IgA 肾病大鼠的尿红细胞、尿蛋白和尿 NAG 水平,从而减少对肾小管间质的损害。

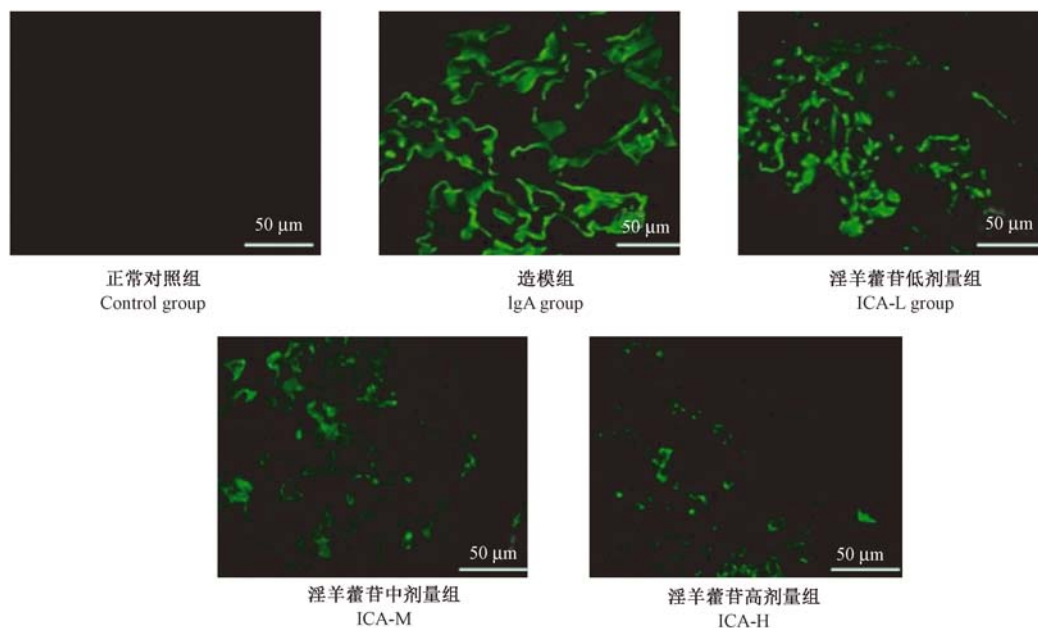


图 1 肾组织 IgA 免疫荧光检测结果

Fig. 1 The immunofluorescence result of IgA

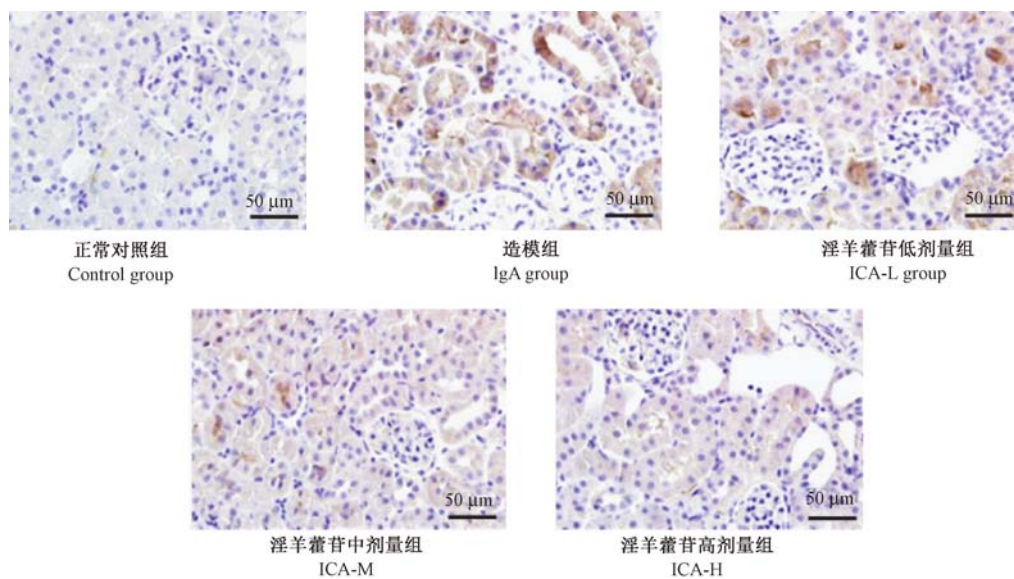


图 2 免疫组化染色检测 NF-κBp65 蛋白的表达变化

Fig. 2 The protein expression of NF-κBp65

核转录因子 κB 是转录因子家族的重要成员,主要参与免疫反应、淋巴细胞分化、细胞内信号传导,参与多种调控多种炎症细胞因子和趋化因子的合成^[8]。NF- κB 参与调控 IL-2、IL-6、IL-8、MCP-1 等参与多种肾脏疾病发生发展过程^[9]。通常 NF- κB 与多肽 p65 和 p50 蛋白亚基组成二聚体,但只有 p65 在蛋白 c 末端含有转录激活区域^[10]。MCP-1 是单核巨噬细胞最重要的趋化和活化因子。研究表明 NF- κB 在肾小球肾炎模型中活性显

著增强,且 MCP-1 的表达上调,抑制 NF- κB 后 MCP-1 的表达下调,提示 MCP-1 的表达与 NF- κB 密切相关^[11,12]。在 IgA 肾病中蛋白尿可引起 NF- κB 的活化,从而增强 MCP-1 的表达,引起单核细胞趋化浸润激活^[13]。本试验研究发现淫羊藿苷抑制 IgA 肾病中 NF- κB 与 MCP-1 的表达,并与剂量呈正相关,提示淫羊藿苷可能通过抑制 NF- κB 与 MCP-1 的表达,从而抑制单核细胞的趋化浸润,从而减轻对肾间质的损伤。

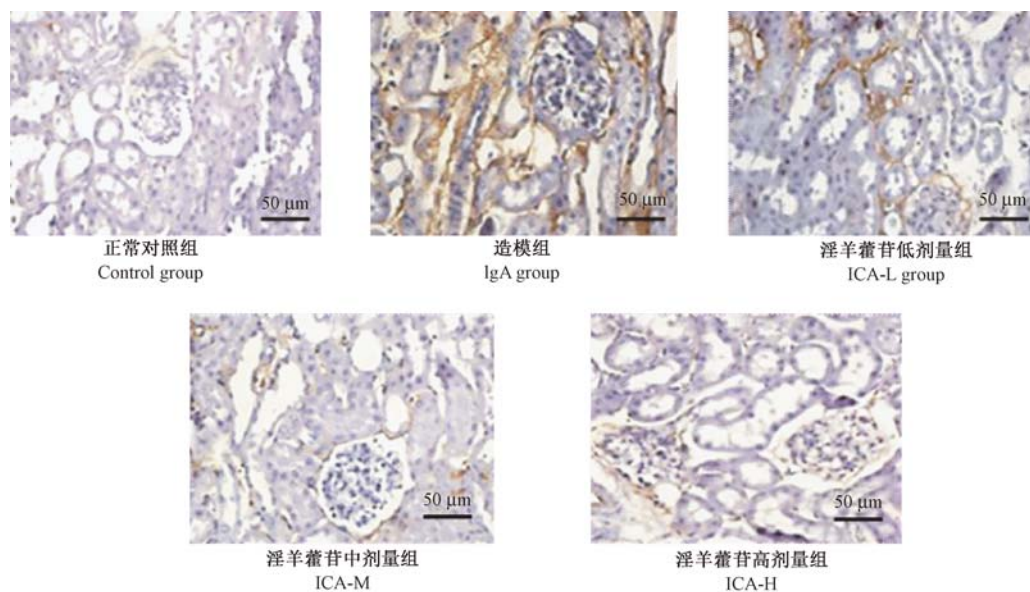
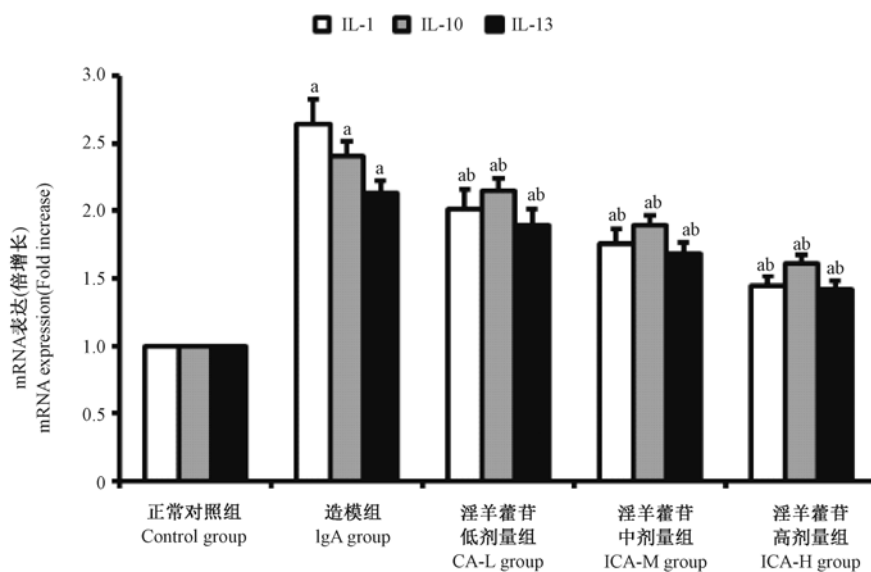


图3 免疫组化染色检测 MCP-1 蛋白的表达变化

Fig.3 The protein expression of MCP-1



注:^a $P < 0.05$ vs con 组;^b $P < 0.05$ vs IgA 组。

图4 淫羊藿苷对 IL-4, IL-10 与 IL-13 mRNA 表达变化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. ^a $P < 0.05$ vs control group. ^b $P < 0.05$ vs IgA group.

Fig.4 The effect on the mRNA expression of IL-4, IL-10 and IL-13 by icariin

IL-4, IL-10 与 IL-13 主要是由 Th2 细胞产生,具有普遍抑制炎症细胞因子的作用,促进抗体的生成,介导体液免疫应答。其中 IL-4 与 IL-13 是可直接影响 IgA 源性 B 细胞的增殖和活化,影响抗体的分泌,对肾小管上皮细胞造成一定的损伤。已有研究发现 IL-4 与 IL-13 对肾小管上皮细胞的形态和功能有所影响,进而对肾小管上皮细胞造成损伤^[14]。徐勇等^[15]研究发现联合应用 IL-4 与 IL-10 可抑制

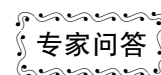
中性白细胞浸润,对肾缺血在灌注损伤的大鼠有肾保护的作用。本研究发现,淫羊藿苷通过抑制 IgA 肾病大鼠肾组织中 IL-4, IL-10 与 IL-13 的表达,从而对肾具有保护作用。

综上所述,淫羊藿苷对 Ig 肾病具有一定的疗效,可能与淫羊藿苷对 NF- κ B 与 MCP-1 因子的表达的影响,以及机体免疫调节有关。

参考文献:

- [1] 史伟,王文健,刘双信,等. IgA 肾病[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:1-29.
- [2] Barratt J, Feehally J. Ig A Nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2005,16(7):2088-2097.
- [3] 吴东方,马俊玲,周健,等. 淫羊藿提取液对庆大霉素急性肾损伤的影响[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(5):270-271.
- [4] 陈香美,田劲,于力方,等. 淫羊藿、虫草菌丝、黄芪防治庆大霉素所致急性肾损伤的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,1993,9(6):758-760.
- [5] 赵勇,崔正言,张玲,等. 淫羊藿苷协同诱导 IL-2、IL-3、IL-6 作用的研究[J]. 中国免疫学杂志,1996,12(1):43-45.
- [6] 汤颖,姜探奇,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.
- [7] Paolo C, Giuseppe R. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease[J]. Br J Clin Pharmacol, 2013,76(4):516-523.
- [8] Jutz S, Leitner J, Schmetterer K, et al. Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: Simultaneous measurement of NF- κ B, NFAT and AP-1[J]. J Immunol Methods, 2016,430:10-20.
- [9] Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, et al. Activation of transcription factor NF- κ B in experimental glomerulonephritis in rats [J]. Biochim Biophys Acta, 1996,1316(2):132-138.
- [10] Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B protein: new discoveries and insights[J]. Annu Rev Immunol, 1996,14:649-683.
- [11] Silva GE, Costa RS, Ravinal RC, et al. NF- κ B expression in IgA nephropathy[J]. Dis Markers,2011,31(1):9-15.

[收稿日期]2016-04-06



问:不同类型的糖尿病动物模型血糖检测在何时进行合适?

答:DM 动物模型分为 1 型糖尿病(T1DM)模型和 2 型糖尿病(T2DM)模型,T1DM 动物模型主要检测空腹血糖,而 T2DM 动物模型除检测空腹血糖外,同时还检测餐后血糖和随机血糖,因此,不同类型的 DM 模型的血糖检测时间和要求也是不同的。

1、空腹血糖检测的合适时间

(1)T1DM 动物模型空腹血糖检测的合适时间,一般在早上 8:00~9:00,大动物要求提前禁食不禁水 12 h 以上,啮齿类动物 T1DM 模型提前禁食不禁水要求 10~12 h。

(2)T2DM 动物模型空腹血糖检测的合适时间:大鼠、小鼠等啮齿类动物 T2DM 模型空腹血糖的合适检测时间是在下午 4:00~5:00,大鼠提前禁食不禁水 6~8 h,小鼠提前禁食不禁水 5~6 h。其它动物 T2DM 模型空腹血糖的合适检测时间是在早上 8:00~9:00,要求提前禁食不禁水 12 h 以上。

2、餐后血糖检测的合适时间

餐后血糖通常是口服葡萄糖耐量试验(OGTT)2 h 血糖,也有研究者采用动物进食后 2 h 或 3 h 血糖。餐后血糖检测的合适时间,一般在早上 8:00~9:00,大动物要求提前禁食不禁水 12 h 以上,啮齿类动物 DM 模型禁食不禁水要求 10~12 h。

3、随机血糖检测的合适时间

大鼠、小鼠等啮齿类动物 T2DM 模型的合适检测时间是在上午未加喂饲料前或在加喂饲料后 3 h 至下午加喂饲料前。其它一日二餐定时饲喂的动物,T2DM 模型随机血糖的合适检测时间是在上午饲喂后 3 h 至下午饲喂前。

(感谢浙江中医药大学动物实验研究中心 陈民利 教授的解答)