

· 论 著 ·

青蒿琥酯对 UUO 模型大鼠肾脏的抗炎作用及其机制研究^{*}

马行一, 吴蔚桦, 曾 燕, 马云霞, 米绪华

(四川大学华西医院肾脏内科 640041)

摘要:目的 观察青蒿琥酯能否有效拮抗肾脏病理性炎症过程的发生以及对肾脏疾病的治疗作用。方法 将雄性 Wistar 大鼠 60 只随机分为 5 组, 包括假手术组(SOR 组)、大剂量青蒿琥酯组(HDA 组)、小剂量青蒿琥酯(SDA 组)、氯沙坦钾组(ARB 组)、UUO 模型对照组(UUO 组)。从模型建立后 24 h 开始灌胃; 其中 SDA、HDA 组分别给予青蒿琥酯 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, ARB 组给予氯沙坦钾 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 大鼠术后 3、7 d 收集 24 h 尿、血、肾组织标本。行一般生化检查及病理染色, 电镜观察细胞器改变情况。免疫组化法检测肾组织中磷酸化 NF-Kappa B, 实时荧光定量 PCR 检测 Smad 7 和 I κ B- α 的 mRNA 表达。结果 (1)UUO 组术后 3、7 d 血肌酐水平高于其他各组($P < 0.05$), 各治疗组不同时间点血肌酐水平差异无统计学意义($P > 0.05$); (2)磷酸化 NF-Kappa B p56 阳性细胞在成模后 3 d 开始增加, UUO 组表达显著高于对照组($P < 0.05$), 各治疗组显著少于 UUO 组($P < 0.05$); (3)RT-PCR 检测 Smad 7 mRNA 在 UUO 组表达相同时间点较 SOR 组略有上升, 各治疗组 Smad 7 亦较 SOR 组有所上升, SOR 组 I κ B- α mRNA 显著高于各实验组($P < 0.05$), 各药物治疗组 I κ B- α mRNA 减低程度弱于 UUO 组($P < 0.05$)。结论 青蒿琥酯可以减轻肾间质炎性损伤, 其机制可能和上调 Smad 7 表达及减少 I κ B- α mRNA 降解有关。

关键词: 青蒿琥酯; 炎症; 核转录因子; 单侧输尿管结扎**中图分类号:** R365.692**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)12-1514-03The anti-inflammatory effect and its mechanism of Artemisia on the renal of UUO rats^{*}

MA Xing-yi, WU Wei-hua, ZENG Yan, et al.

(Department of Nephrology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To investigate the potential effect of Artemisia annua, in the treatment of pathological inflammation in UUO model. **Methods** Rats were randomly assigned into 5 groups, including unilateral ureteral obstruction model group(UUO), sham-operated group(SOR), small does Artemisia annua-treated group(SDA), high does Artemisia annua-treated group(HDA) and ARB-treated group. From the first day after initial UUO operation, SDA, HDA and ARB groups were intragastrically administrated at Artemisia annua 25mg/Kg and 50 mg/Kg, losartan 20 mg/Kg every day. **Results** (1)SCR of UUO group was significantly higher than other groups($P < 0.05$), and there was no significant difference among the groups in different time points ($P > 0.05$); (2)NF-kappa B p56 had no or less expression in SOR group, and positive cells of p56 in treated groups were significantly less than UUO group($P < 0.05$); (3)Smad 7 mRNA of UUO group was higher than SOR group in the same time point; and treated groups smad 7 increased comparing SOR group. I κ B- α mRNA of SOR group was significantly higher than experimental groups($P < 0.05$), and decline of I κ B- α mRNA was weaker in treated groups than UUO group($P < 0.05$). **Conclusion** Artemisia may alleviate inflammatory injury in renal via up-regulating the expression of Smad 7 and decreasing TNF- α and the degradation of I κ B- α .

Key words: artemisia; inflammation; NF-kappa B; unilateral ureteral obstruction

抗疟疾药物有效成分青蒿素由中国药学工作者于 1971 年分离成功, 后又在此基础上开发双氢青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯等衍生物^[1]。新近发现青蒿素类药物还有抗纤维化、抗肿瘤、抗炎等作用。在本研究的前期研究中, 通过应用青蒿琥酯干预 UUO 大鼠, 也发现其可降低 UUO 大鼠模型肾间质 CTGF 和 α -SMA 的表达并呈剂量依赖性^[2]。本研究在原有工作基础上, 进一步采用左侧输尿管结扎大鼠模型, 观察青蒿琥酯干预动物模型的抗炎作用, 探讨青蒿素类药物在肾脏病领域的应用。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 4~6 周龄, 体质量 (200 ± 20)g, 购自四川大学华西实验动物中心。随机分为假手术组(SOR 组)、模型组(UUO 组)、青蒿琥酯小剂量治疗组(SDA 组)、青蒿琥酯大剂量治疗组(HDA 组)和氯沙坦组(ARB 组)。

1.2 试剂及主要设备 青蒿琥酯片(50 mg/片)、氯沙坦钾片(50 mg/片)、注射用苯唑西林钠。兔抗大鼠磷酸化 NF-Kappa B 多克隆抗体(ser276)(cell signaling # 3037)、兔抗大鼠 Smad 7 多克隆抗体(武汉博士德 BA1399)、HRP 标记羊抗兔 IgG(北京中山生物技术公司)、Trizol(美国, BRC)、RNA 提取试剂盒(QIAGEN)、反转录试剂(立陶宛 MBI)、dNTP(Promega)等。DNA Engine Opticon™ 实时荧光定量 PCR 仪(美国 M J Research 公司)。

1.3 引物与 Taqman 探针序列 Taqman 探针 5' 端标记的 FAM 为荧光报告基团, 3' 端标记的 TAMRA 为荧光淬灭基团。引物及探针序列见表 1。

1.4 动物分组及造模型 动物适应喂养后, 按照前期实验方法^[2]制备(UUO)动物模型, SOR 组除不结扎离断输尿管外, 其余同 UUO 组。从术后 24 h 开始, HDA、SDA 组分别给予青蒿

* 基金项目: 四川省中医药管理局基金资助项目(2004A61); 成都市科技局基金项目资助(07GGYB627SF-010)。

琥酯 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹、25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 灌胃, ARB 组给予氯沙坦钾 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 灌胃, SOR 组和 UUO 组给予等比例生理盐水灌胃。术后第 3、7 天随机处死各组大鼠 6 只。取右肾组织, 部分保存于 Carnoy's 固定液中, 用于 HE、Masson 染色和免疫组织化学检测; 部分液氮快速冷却以提取 mRNA。

表 1 PCR 引物及探针序列

探针	引物	序列
Smad 7: 探针	上游:	5'-CTGCAACCCCATCACCTTA-3',
	下游:	5'-CCAGAAGAAGTTGGGAATCTGA-3'
	引物:	5'-CTCCTTACTCCAGATACCCGATG-3'
IκB-α: 探针	上游:	5'-AACCTGCAGCAGACTCCACT-3'
	下游:	5'-CAGCCCTGCTCACAGGCAAG-3'
	引物:	5'-CTGGCTGTGATCCTGAGCT-3
β-actin: 探针	上游:	5'-GCCAACACAGTGTGTCT-3'
	下游:	5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3'
	引物:	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3'

1.5 主要观察指标和方法

1.5.1 大鼠处死前心脏取血检测血肌酐水平。

1.5.2 HE 染色、Masson 染色观察一般病理变化, 电镜观察肾脏组织细胞变化。

1.5.3 免疫组织化学染色检测磷酸化 NF-Kappa B 本研究采用 SP 法检测磷酸化 NF-Kappa B 的 P56 亚基核转移的情况。染片后在光镜下选择 10 个连续不重复视野(×1 000 倍), 以光镜下细胞核被染成棕黄色为核阳性细胞。计数各视野中核阳性细胞数量, 取平均值为该片核阳性细胞数, 结果以(核阳性细胞数/HP)表示。

1.5.4 实时荧光定量 PCR 法检测各组 Smad 7 和 IκB-α 的 mRNA 表达 将 Trizol 法提取的组织 RNA 用紫外分光光度计测定浓度后, 取总 RNA 进行逆转录反应。采用 DNA Engine Opticon™ 实时荧光定量 PCR 仪以 30 μL 反应体系进行 PCR 扩增。采用 β-actin 为内参照。读取待测目的 mRNA 进入指数增长期的循环数记为 CT 值, 经内参校正后与 SOR 组比较, 求出样本针对 SOR 组的相对拷贝数, 即以待测标本基因表达与 SOR 组基因表达的倍数关系进行数据统计分析。

1.6 统计学方法 运用 SPSS13.0 统计软件包处理。组间差异比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 进行统计分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠一般情况及血生化指标 实验开始前, 各组大鼠体毛、色泽正常无明显差异, 尾部红润, 正常进食, 活动灵敏, 对声响、光等刺激反应迅速, 机敏, 生长正常, 大小便无异常表现。行造模手术后, 各组手术大鼠出现不同程度活动减少, 进食减少, 毛色暗淡。造模手术各组实验大鼠血肌酐水平均有不同程度升高, 以 UUO 组明显。不同时点观察, 各治疗组大鼠血肌酐水平无明显差异, 见表 2。

2.2 各组大鼠肾脏组织病理表现 SOR 组 HE 染色各时间点未见肾脏有明显异常; UUO 术后 3 d 可见远端小管扩张, 上皮细胞轻度浊肿、空泡变性, 肾间质轻度水肿, 间质内有散在淋巴细胞、巨噬细胞浸润, 肾小球结构正常; UUO 术后第 7 天可见肾小管上皮细胞肿胀变性, 部分细胞嗜酸性变, 部分肾小管灶

性萎缩, 管腔轻度扩张, 管腔内见蛋白管型及上皮细胞管型, 肾小管间质稍增宽, 其间可见成纤维细胞轻度增生及少量淋巴细胞为主的炎细胞浸润。电镜下见 UUO 大鼠细胞内溶酶体增多, 胞浆内可见大小不等的空泡, 内质网及线粒体组织改变不显著, 见图 1、2。

表 2 UUO 模型各组血肌酐变化 (mmol/L)

组别	剂量(kg/d)	造模术后 3 d	造模术后 7 d
SOR 组	10 mL	39.92±4.43	40.03±5.11
SDA 组	25 mg	45.84±4.49 [#]	55.69±3.32 [#]
HDA 组	50 mg	44.61±4.44 [#]	56.31±4.09 [#]
ARB 组	20 mg	45.12±4.95 [#]	50.94±3.61 [#]
UUO 组	10 mL	63.16±7.94 [*]	146.76±6.63 [*]

与 SOR 组相比, * : P<0.05; 与 UUO 组比较, [#] : P<0.05。

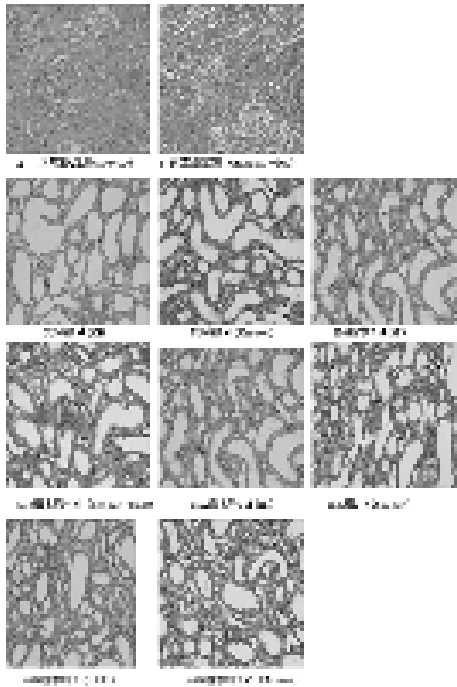
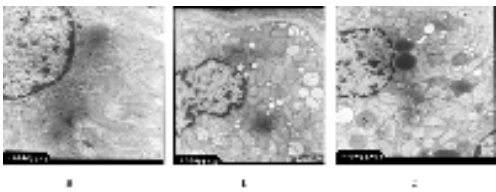


图 1 肾脏病理 7 d 标本(×400)



A: 正常肾组织线粒体; B: UUO 组肾组织; C: UUO 组溶酶体较 A 明显增多。

图 2 UUO 大鼠肾组织电镜下表现(×10 000)

表 3 NF-Kappa B 阳性细胞计数(个/HP)

组别	术后 3 d	术后 7 d
SOR 组	1.13±0.21	1.38±0.24
UUO 组	34.05±2.72	57.41±5.44
SDA 组	26.20±3.63	41.13±3.50
ARB 组	25.51±2.99	30.93±5.20
HDA 组	18.41±2.99	26.03±3.17

2.3 NF-Kappa B P65 阳性细胞分析 P65 阳性细胞 SOR 组散在可见,随着各组 UUO 造模时间延长,P65 阳性细胞数显著增加,以小管细胞核阳性多见。各治疗组与 UUO 组在术后 3、7 d 比较阳性细胞数各治疗组显著少于 UUO 组($P<0.05$),以 HDA 组减少最为明显($P<0.05$),见表 3、图 3。

2.4 PT-PCR 检测 按所述反应体系进行 45 个循环,根据所检测样本进入基因对数倍增期所得循环数读取 CT 数值,其中 IkB- α 合成片段全长 143 bp,Smad 7 合成片段全长 184 bp。统计分析可见 IkB- α mRNA 在造模后表达明显下降,其中 UUO 组下降最为明显($P<0.05$),Smad 7 的 mRNA 表达上升,药物干预组 Smad 7 水平显著高于 UUO 组($P<0.05$),见表 4、5。

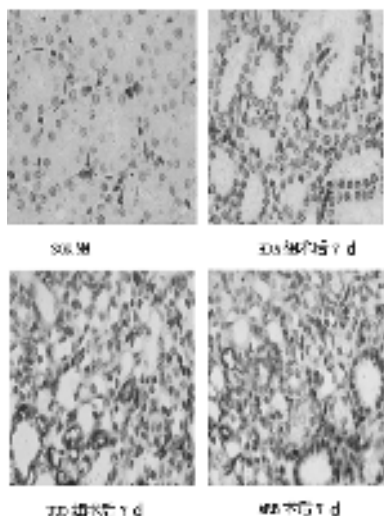


图 3 NF-Kappa B 阳性细胞染色($\times 1\ 000$)

表 4 IkB- α 相对拷贝数计算

组别	术后 3 d 相对拷贝数(倍)	术后 7 d 相对拷贝数(倍)
HDA 组	0.49 $\pm$ 0.26*	0.46 $\pm$ 0.34*
SDA 组	0.17 $\pm$ 0.11*	0.10 $\pm$ 0.04*
ARB 组	0.37 $\pm$ 0.33*	0.28 $\pm$ 0.18*
UUO 组	0.04 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.03

UUO 组比较,* : $P<0.05$ 。

表 5 Smad 7 相对拷贝数计算

组别	术后 3 d 相对拷贝数(倍)	术后 7 d 相对拷贝数(倍)
HDA 组	13.80 $\pm$ 10.28*	24.55 $\pm$ 8.57*
SDA 组	3.97 $\pm$ 3.17*	5.15 $\pm$ 2.10*
ARB 组	9.77 $\pm$ 4.07*	10.23 $\pm$ 5.18*
UUO 组	2.80 $\pm$ 2.63	2.22 $\pm$ 1.15

UUO 组比较,* : $P<0.05$ 。

3 讨 论

病理性的炎症过程贯穿于各种急慢性肾损伤的全过程,是各种常见肾脏疾病造成组织结构及功能损害的重要途径。肾脏的炎症发生过程复杂,与多种细胞信号传导通路及细胞因子关系密切。炎症过程所导致的结果表现形式多样,包括肾纤维化损伤、新月体形成、肾小球系膜细胞凋亡损伤过程中,均伴随有形式多样的病理炎症状态作用。目前炎症作为发病机制已见于多种肾脏疾病^[3-5]。有效的抑制炎症过程的发生已经成为

各种肾脏病新药开发的共同靶点。

本研究选取的青蒿琥酯药理作用及药代学明确^[1],以往作为一种经典抗疟疾药物使用,新近发现其还有抗寄生虫、抗炎等作用^[6-7],在肾脏病领域研究目前还处于起步阶段,本研究选择的观测指标核因子 NF-Kappa B 在炎症过程的发生中居于核心地位。本文所检测的 P65 亚基为其中的一个重要功能亚基,在蛋白酶水解 NF-Kappa B 抑制物后进入细胞核内,启动炎症过程;本文所检测的另一指标 IkB- α 就是一种起重要作用的 NF-Kappa B 抑制物。由于 NF-Kappa B 的 mRNA 表达水平并不能反映 NF-Kappa B 整个功能水平,所以本研究并未进行 P65 的 mRNA 水平检测。

本研究采用的单侧输尿管结扎大鼠模型成功复制了肾脏疾病的炎症发生,电镜照片也证实这点。从研究结果看青蒿琥酯能有效抑制 NF-Kappa B 通路的表达,干扰 IkB 水解而起到抗炎作用,同时也发现青蒿琥酯能上调另一类重要抑制性 Smad 蛋白——Smad 7 的表达。以往对 Smad 7 的研究主要局限于其对 TGF- β_1 表达通路的抑制。新近发现 Smad 7 可以调控多个与炎症相关的信号传导。已有研究发现上调 Smad 7 表达,可以在 UUO 大鼠模型及大鼠新月体肾炎模型体现出较好的抗炎效应^[8]。由此可见,青蒿琥酯的抗炎效应部分可能是通过上调 Smad 7 表达所致。

总之,青蒿琥酯有良好的抗炎效应,可以改善 UUO 模型大鼠炎症过程的发生,有一定的潜在临床价值。

参考文献:

- [1] 戴小军,刘延庆,梅全喜. 蒿属药用植物药理活性研究进展[J]. 中药材,2005,28(3):243.
- [2] 米绪华,栾森,曾燕. 青蒿琥酯对 UUO 模型大鼠肾组织 CTGF 和 α -SMA 表达的影响[J]. 西部医学,2007,19(3):332.
- [3] Eric G, Neilson, William G, et al. 免疫肾脏病学[M]. 2 版. 大连:辽宁科学技术出版社,2006:283.
- [4] Chung CP, Oeser A, Solus J, et al. Inflammatory mechanisms affecting the lipid profile in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol,2007,34(9):1849.
- [5] Nelson CL, Karschimkus CS, Dragicevic G, et al. Systemic and vascular inflammation is elevated in early IgA and type 1 diabetic nephropathies and relates to vascular disease risk factors and renal function[J]. Nephrology Dialysis Transplantation,2005,20(11):2420.
- [6] 刘成伟,陈雅棠,李文桂. 扫描电镜观察双氢青蒿素对大鼠体内卡氏肺孢子虫表面形态的影响[J]. 重庆医学,2004,33(6):838.
- [7] Li WD, Dong YJ, Tu YY, et al. Dihydroartemisinin ameliorates lupus symptom of BXSB mice by inhibiting production of TNF- α and blocking the signaling pathway NF-kappa B translocation [J]. Int Immunopharmacol, 2006,6(8):1243.
- [8] Huang XR, Chuang AC, Zhou L, et al. Latent TGF- β 1 protects against crescentic glomerulonephritis[J]. J Am Soc Nephrol,2008,19(2):233.