

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.008

芦丁对梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤及 Nrf2/HO-1 通路的影响*

王 斌¹,赵 明²,陈志勇¹,赖永通¹,郭雪坤¹,黄先恩¹,赵国志¹,蔡瑞明¹,林民专^{1△}

(1. 广州医科大学附属第三医院器官移植科,广州 510150;2. 南方医科大学珠江医院器官移植科,广州 510282)

[摘要] **目的** 探讨芦丁对梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤及 Nrf2/HO-1 通路的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠分为 4 组:假手术组、芦丁治疗假手术组、模型组、芦丁治疗模型组。术后 24 h,芦丁治疗假手术组和芦丁治疗模型组给予芦丁[100 mg·kg⁻¹·d⁻¹溶于 1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液]灌胃,其他两组给予等体积的 1% CMC-Na 溶液灌胃。术后 2 周处死全部大鼠,取梗阻侧肾组织测定脂质过氧化产物丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,用苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肾脏病理改变,免疫组织化学方法检测肾组织内血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白的表达水平。Western blot 方法检测肾组织中核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)和 HO-1 蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组肾脏病理损害明显加重,肾组织内 MDA 水平明显增加($P<0.05$),SOD 及 GSH-Px 活性明显降低($P<0.05$),Nrf2 与 HO-1 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,芦丁治疗模型组肾脏病理损害明显减轻,肾组织内 MDA 水平明显减少($P<0.05$),SOD 及 GSH-Px 活性明显升高($P<0.05$),Nrf2 与 HO-1 蛋白表达水平进一步升高($P<0.05$)。**结论** 芦丁可减轻梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤,此效应可能是通过介导 Nrf2/HO-1 信号通路实现。

[关键词] 芦丁;梗阻性肾病;氧化性应激;血红素加氧酶-1;核因子 E2 相关因子 2
[中图法分类号] R692.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0212-05

Effects of rutin on kidney oxidative stress and Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats with obstructive nephropathy*

WANG Bin¹,ZHAO Ming²,CHEN Zhiyong¹,LAI Yongtong¹,GUO Xuekun¹,
HUANG Xian'en¹,ZHAO Guozhi¹,CAI Ruiming¹,LIN Minzhuan^{1△}

(1. Department of Organ Transplantation, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects and mechanisms of rutin on kidney oxidative stress injury and Nrf2/HO-1 signaling in rats with obstructive nephropathy. **Methods** Male Wistar rats were divided into 4 groups: the sham group, the rutin+sham group and the operated group, the rutin+operated group. Rats in the rutin+sham group and the rutin+operated group were intragastrically administered with rutin [100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ dissolved in 1% carboxymethylcellulose-Na (CMC-Na) buffer]. The other two groups were given an equal volume of 1% CMC-Na solution by gavage. 2 weeks after surgery, all rats were sacrificed and the obstructed kidneys were harvested. Level of malondialdehyde (MDA), activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the obstructed kidneys were measured. Hematoxylin and eosin (HE) staining was performed to observe the pathological changes of the obstructed kidney. Expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in renal tissues were analyzed by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the expression of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) and HO-1 protein. **Results** Compared with the sham group, rats in the operated group showed significant kidney pathological injury, the level of MDA increased ($P<0.05$). The expression of Nrf2 and HO-1 increased, and the activity of SOD and GSH-Px decreased significantly ($P<0.05$). Comparing with the operated group, the rutin+operated group showed that rutin ameliorated histological injury obviously, decreased the level of MDA, increased the activities of SOD and GSH-Px, and

* 基金项目:广东省科学技术厅科技计划项目(2016A020220014)。 作者简介:王斌(1990—),住院医师,硕士,主要从事器官移植研究。
△ 通信作者,E-mail:lmz4919@126.com。

enhanced the expression of Nrf2 and HO-1 in rats. **Conclusion** Rutin could ameliorate oxidative stress in rats with obstructive nephropathy via Nrf2/HO-1 signaling pathway possibly.

[Key words] rutin; obstructive nephropathy; oxidative stress; heme oxygenase-1; nuclear factor-E2-related factor 2

梗阻性肾病可造成肾小管间质纤维化和肾脏结构改变,严重者可导致肾脏功能丧失,是儿童及成人终末期肾衰竭的常见原因。单侧输尿管梗阻(unilateral urethral obstruction, UUO)是目前最常用的肾脏损伤动物模型之一。它可以模拟慢性梗阻性肾病的病理发展过程,如氧化应激、炎症反应、胶原成分的异常沉积和肾间质纤维化等。近年来,大量研究证实氧化应激与多种肾脏病的发生、发展密切相关,针对氧化应激及抗氧化机制进行肾脏病防治已成为国内外诸多学者共同关注的焦点^[1-2]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)是内源性抗氧化机制中的关键因子,通过激活 Nrf2,可进一步诱导血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)等下游信号分子的表达,从而发挥抗氧化应激作用^[3]。

芦丁是生物黄酮素家族成员之一,它具有抗氧化、抗炎症、抗过敏、抗病毒、抗癌等广泛的药理作用^[4-5]。在前期的实验研究中,本课题组已证实芦丁能有效改善 UUO 大鼠肾脏炎症及纤维化。此外,国内外研究表明,芦丁对缺血再灌注肾损伤^[6]、糖尿病肾病^[7]、药物性肾损害^[8]等具有显著的保护作用,均与抗氧化应激有关。然而,芦丁对于梗阻性肾病的氧化应激损伤的作用情况及机制尚不清楚。本研究拟通过观察芦丁对 UUO 大鼠肾脏氧化应激损伤的影响,进一步探讨芦丁对肾脏保护作用的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重 200~250 g,购于南方医科大学动物实验中心[SCXK(粤)2011-0015]。

1.2 试剂 芦丁水合物(浓度大于或等于 94%)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购自美国 Sigma 公司,兔抗大鼠 HO-1 单克隆抗体、兔抗大鼠 Nrf2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,免疫组织化学试剂盒(批号:PV-9000)、二甲基邻苯二胺(DAB)显色试剂(批号:ZLI-9018)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及 UUO 模型制备 将 24 只 Wistar 大鼠分为 4 组:假手术组、芦丁治疗假手术组、模型组、芦丁治疗模型组,每组 6 只。模型组和芦丁治疗模型组大鼠经 5% 戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,经腹部正中切口逐层打开

腹腔,暴露并钝性分离左侧输尿管,分别在左侧髂动脉处及近肾盂处用 4-0 线结扎左侧输尿管,并于两线结之间剪断输尿管,最后逐层缝合并关闭腹腔。假手术组和芦丁治疗假手术组大鼠仅分离左侧输尿管但不行结扎,其余手术步骤与模型组大鼠相同。术后 24 h,芦丁治疗假手术组和芦丁治疗模型组大鼠给予芦丁($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 溶于 1% CMC-Na 溶液)灌胃,其余两组大鼠给予等体积 1% CMC-Na 溶液灌胃。

1.3.2 标本采集及处理 各组大鼠均于术后第 14 天处死。留取左侧肾脏,部分肾组织用 4% 多聚甲醛进行固定,用于苏木素-伊红(HE)染色和免疫组织化学检测,其余肾组织置于一 80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.3.3 肾组织病理学检查 取 4% 多聚甲醛固定后的左肾组织,常规行脱水、透明、包埋,切成 4 μm 厚的切片,行 HE 染色,每张切片在光学显微镜($\times 200$)下采集 10 个不重复视野。根据文献[9]的方法,采用肾小管扩张、小管萎缩、小管细胞空泡形成、蛋白管型、红细胞管型、间质炎性细胞浸润、间质纤维化和间质水肿共 8 项病变指标,每项指标评分为 0~3 分:正常 0 分,轻度 1 分,中度 2 分,重度 3 分。对每张 HE 染色切片进行肾间质损伤评分,最后统计并取平均值作半定量分析。

1.3.4 肾组织 MDA 水平及 SOD、GSH-PX 活性的测定 运用考马斯亮蓝法测定匀浆液蛋白质水平后,参照南京建成生物公司试剂盒提供的检测方法进行操作,分别测定肾组织匀浆液的 MDA 水平及 SOD、GSH-PX 活性。

1.3.5 免疫组织化学染色法检测 HO-1 石蜡切片常规脱蜡至水,用 0.01 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原微波修复。冷却至室温后,用 3% H_2O_2 孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。滴加抗 HO-1 抗体(1:200)孵育,4 ℃ 过夜后,37 ℃ 孵育 1 h,滴加二抗,37 ℃ 孵育 20 min, DAB 显色,镜下观察;HE 复染,自来水冲洗后 1% 盐酸乙醇分化,常规脱水透明,中性树胶封片。每张切片在光学显微镜下($\times 200$)采集肾间质区域 10 个不重复视野,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分别计算每个视野下的阳性区域面积,并取平均值作半定量分析。

1.3.6 Western blot 检测 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达 取 -80 ℃ 保存的肾组织,按分子克隆实验指南的方法对肾组织进行匀浆、裂解,分别抽提核蛋白和总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。吸取等量蛋白样品(50 μg),经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

(SDS-PAGE)电泳分离后,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,再依次经 5%脱脂牛奶封闭、加入一抗(Nrf2、HO-1,均按 1:1 000 稀释)4℃孵育过夜、加入二抗室温孵育 1 h 后,用 ECL 化学发光法显影,最后采用 Image J 软件对各条带进行半定量分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

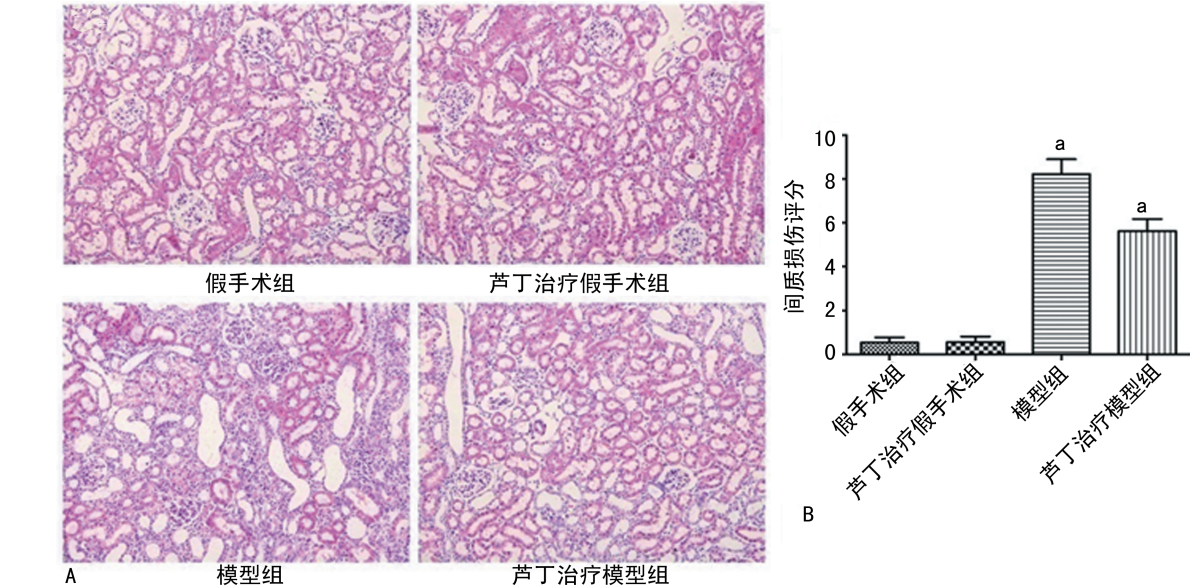
2 结 果

2.1 各组大鼠肾脏组织病理学表现 HE 染色显示,假手术组及芦丁治疗假手术组肾小管及肾小球大小、形态均未见异常,间质无增宽及水肿,无炎性细胞浸润。模型组可见肾小管扩张,小管上皮细胞变性、肿胀、坏死及脱落,小管萎缩,肾间质明显增宽,肾间质大量炎性细胞浸润。芦丁治疗模型组肾小管损伤、炎性细胞浸润较模型组减轻。肾间质损伤评分显示:与假手术组比较,模型组肾间质损伤明显加重($P < 0.05$);与模型组比较,芦丁治疗模型组肾间质损伤明

显减轻($P < 0.05$),见图 1。

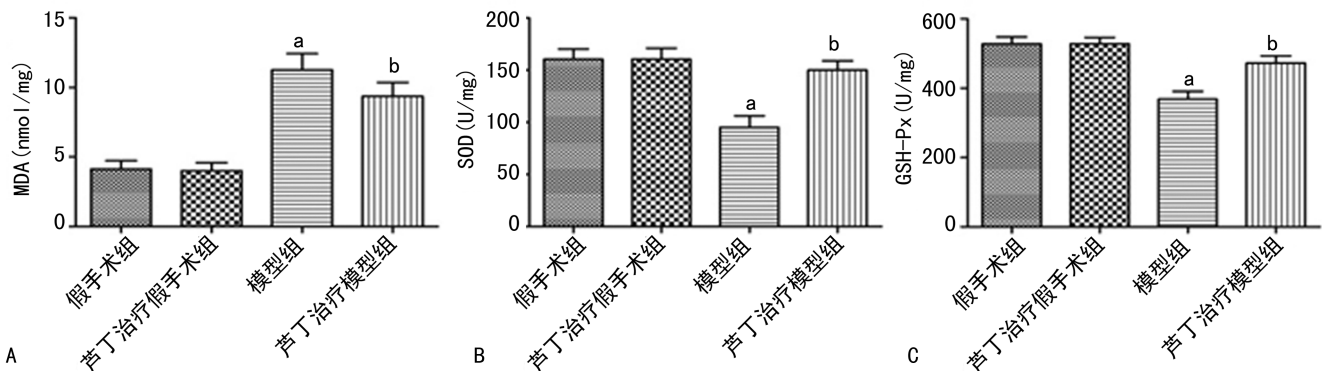
2.2 各组大鼠肾脏 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性变化 与假手术组比较,模型组肾组织中 MDA 水平明显升高,SOD 和 GSH-Px 活性明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,芦丁治疗模型组肾组织中 MDA 水平明显降低,SOD 和 GSH-Px 活性明显升高($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组大鼠肾脏 Nrf2、HO-1 的表达 免疫组织化学染色图片及半定量分析结果显示,HO-1 蛋白主要见于肾小管上皮细胞,在假手术组肾脏组织中有少量表达。与假手术组比较,模型组肾脏 HO-1 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,芦丁治疗模型组肾脏 HO-1 蛋白表达进一步增加($P < 0.05$)。Western blot 免疫印记条带及半定量分析结果显示,假手术组肾脏组织 Nrf2、HO-1 蛋白均有少量表达。与假手术组比较,模型组 Nrf2、HO-1 蛋白表达均明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,芦丁治疗模型组 Nrf2、HO-1 蛋白表达进一步增加($P < 0.05$),见图 3。



A:肾组织 HE 染色($\times 200$);B:间质损伤评分;^a: $P < 0.05$,与假手术组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较

图 1 各组大鼠肾脏病理学表现



A:MDA 水平;B:SOD 活性;C:GSH-Px 活性;^a: $P < 0.05$,与假手术组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较

图 2 各组大鼠肾脏 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性情况

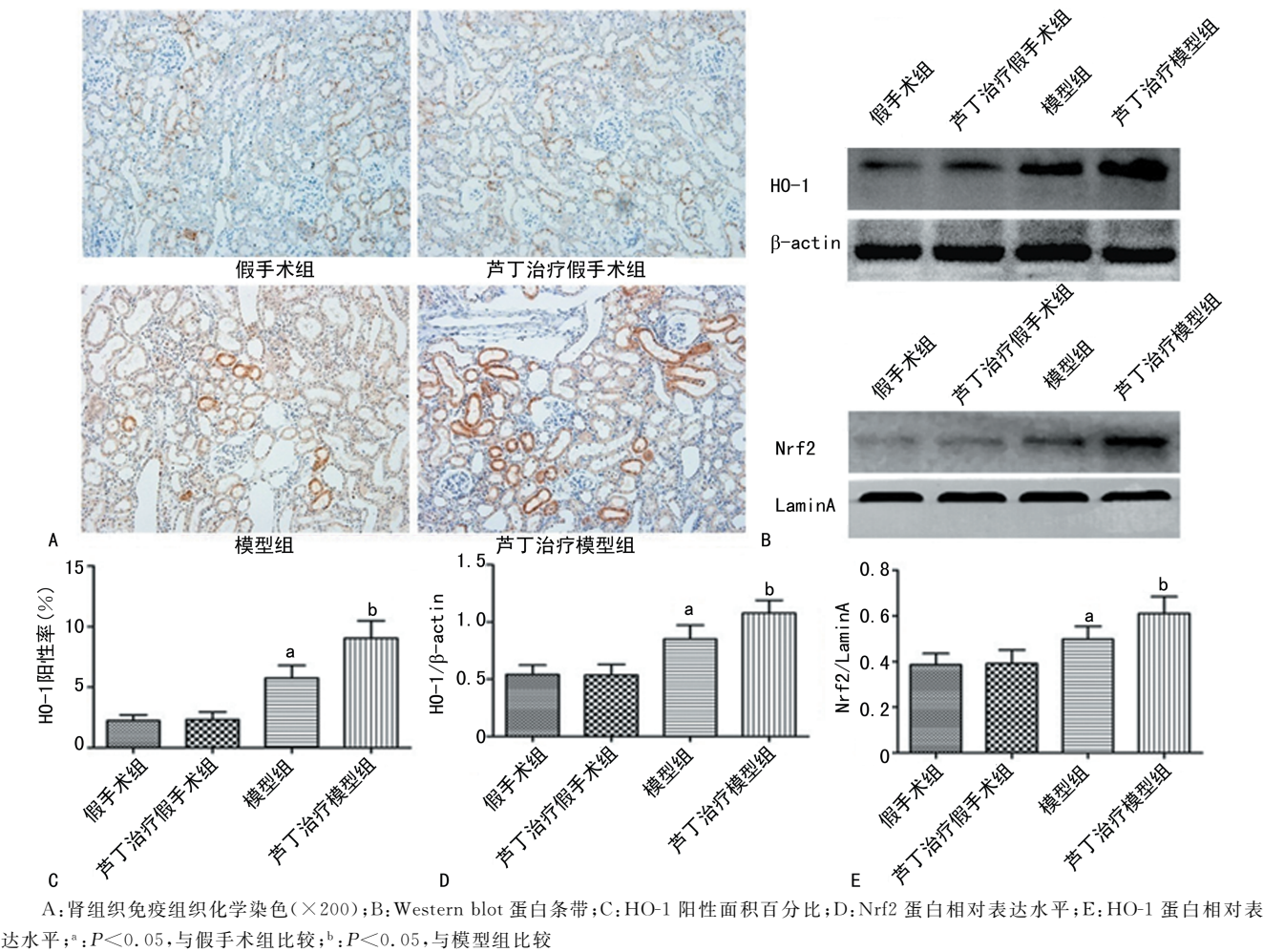


图 3 各组大鼠肾脏 Nrf2、HO-1 的表达情况

3 讨 论

梗阻性肾病的发病机制十分复杂,而由其所致的肾脏血流动力学改变、缺血缺氧和代谢紊乱,可进一步引起氧化应激损伤、炎性细胞浸润、肾小管损伤、细胞增殖及转分化、胶原成分沉积等一系列病理变化,严重者可出现肾脏纤维化甚至肾衰竭。近年有研究发现,氧化应激反应在梗阻性肾病、糖尿病肾病、肾缺血再灌注损伤、药物性肾损害等急、慢性肾脏病的病理过程中扮演重要角色^[10-11]。

UUO 是目前建立梗阻性肾病最常用的动物实验模型。本研究采用该模型建立大鼠梗阻性肾病,与既往研究一致^[9],本课题组通过 HE 染色观察到模型组大鼠梗阻肾脏出现显著的病理损伤,主要表现为肾小管扩张或萎缩、小管细胞空泡变性、炎性细胞浸润、间质水肿增宽和纤维化等。与模型组比较,芦丁治疗模型组大鼠肾脏的病理损伤明显减轻,这表明芦丁对梗阻性肾病具有保护作用。

氧化应激是指在各种刺激因素的作用下,机体内活性氧(reactive oxygen species,ROS)过度产生与抗氧化防御机制失衡的一种反应状态,通常表现为大量 ROS 的产生,以及 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶的减少。UUO 可造成肾组织缺血、缺氧,进而导致大量 ROS 产生^[12]。ROS 可通过脂质过氧化,促使 DNA 分解,

进而造成肾间质损伤。MDA 是组织发生氧化应激反应后的一种脂质过氧化产物,其水平可反映组织细胞氧化应激损伤的严重程度^[13]。SOD 和 GSH-Px 是体内关键的抗氧化酶,它们在清除 ROS 的过程中发挥重要作用^[14]。本研究观察到,与假手术组比较,模型组大鼠 MDA 水平明显增加,SOD 和 GSH-Px 活性明显降低,表明 UUO 大鼠梗阻肾脏发生氧化应激损伤,同时抗氧化能力受损。与模型组比较,芦丁治疗模型组 MDA 水平明显减少,SOD 和 GSH-Px 活性明显升高,表明芦丁具有抗氧化应激损伤作用。国外研究也证实,在糖尿病肾病^[7]、肾缺血再灌注损伤^[6]、胆管梗阻性肝损害^[15]等动物实验中,芦丁能减少 MDA 水平,增强 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶活性,从而减轻氧化应激损伤。

Nrf2 是参与调节机体天然抗氧化应激防御系统的主要调控因子。在机体正常生理条件下,Nrf2 主要与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1,Keap1)结合,并以无活性状态存在于细胞质中。当出现氧化应激等刺激时,Nrf2 与 Keap1 解离并迁移至细胞核内与 ARE 结合,调控多种抗氧化酶及解毒酶如过氧化氢酶、SOD、HO-1、GSH-Px、NAD(P)H:醌氧化还原酶-1[NAD(P)H:quinine oxidoreductase-1,NQO-1]等靶基因的转录,从而发挥其

抗氧化应激等作用^[16-17]。越来越多的研究表明,Nrf2在许多肾脏疾病中具有肾脏保护作用^[18-20]。其中,以Nrf2信号通路为靶点进行干预在UUO所致梗阻性肾病中取得了良好的肾脏保护效应^[21-22]。KONG等^[23]研究发现,Nrf2^{-/-}大鼠UUO后肾脏损伤较Nrf2^{+/+}大鼠明显加重,此外,UUO本身可诱导正常大鼠梗阻肾脏Nrf2信号通路的激活。与该研究一致,本研究中笔者观察到模型组大鼠梗阻肾脏细胞Nrf2、HO-1的表达较假手术组均明显上调。此外,本研究发现,与模型组大鼠比较,芦丁治疗模型组大鼠Nrf2、HO-1的表达进一步上调,表明芦丁的肾脏保护作用可能与增强Nrf2信号通路转导有关。已有研究证实,芦丁在胆管梗阻性肝损害^[15]、糖尿病性神经病变^[24]、四氯化碳毒性肝损害^[25]等具有保护作用,其作用机制均与调控Nrf2/HO-1通路有关。

综上所述,芦丁可减轻梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤,其治疗作用可能是介导Nrf2/HO-1信号通路实现。同时,本研究揭示了Nrf2/HO-1信号通路在梗阻性肾病中的保护作用,为发掘梗阻性肾病治疗靶点提供了新的思路。

参考文献

- GORIN Y. The kidney: an organ in the front line of oxidative stress-associated pathologies[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(12): 639-641.
- MODARESI A, NAFAR M, SAHRAEI Z. Oxidative stress in chronic kidney disease[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2015, 9(3): 165-179.
- MA Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53(1): 401-426.
- HOSSEINZADEH H, NASSIRI-ASL M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid [J]. *J Endocrinol Invest*, 2014, 37(9): 783-788.
- GANESHPURKAR A, SALUJA A K. The pharmacological potential of rutin[J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(2): 149-164.
- KORKMAZ A, KOLANKAYA D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney[J]. *J Surg Res*, 2010, 164(2): 309-315.
- KAMALAKKANNAN N, STANELY M P P. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues[J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 293(1): 211-219.
- KANDEMIR F M, OZKARACA M, YILDIRIM B A, et al. Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy in rats[J]. *Ren Fail*, 2015, 37(3): 518-525.
- LIU C, MEI W, TANG J, et al. Mefunidone attenuates tubulointerstitial fibrosis in a rat model of unilateral ureteral obstruction[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e129283.
- DENDOOVEN A, ISHOLA D J, NGUYEN T Q, et al. Oxidative stress in obstructive nephropathy[J]. *Int J Exp Pathol*, 2011, 92(3): 202-210.
- YANG S, XIAO L, LI J, et al. Oxidative stress, a common molecular pathway for kidney disease: role of the redox enzyme p66Shc[J]. *Renal failure*, 2014, 36(2): 313.
- WANG F M, YANG Y J, MA L L, et al. Berberine ameliorates renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in rats[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2014, 19(9): 542-551.
- OTUNCTEMUR A, OZBEK E, CAKIR S S, et al. Beneficial effects montelukast, cysteinyl-leukotriene receptor antagonist, on renal damage after unilateral ureteral obstruction in rats[J]. *Int Braz J Urol*, 2015, 41(2): 279-287.
- REN Y, DU C, SHI Y, et al. The Sirt1 activator, SRT1720, attenuates renal fibrosis by inhibiting CTGF and oxidative stress[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1317-1324.
- PAN P H, LIN S Y, WANG Y Y, et al. Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 73(1): 106-116.
- SZKLARZ G. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53(1): 401.
- AL-SAWAF O, CLARNER T, FRAGOULIS A, et al. Nrf2 in health and disease: current and future clinical implications[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(12): 989-999.
- SAITO H. Toxicopharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(7): 865-872.
- GUERRERO H M, FARRE A V, PALOMINO A A, et al. Targeting Nrf2 in protection against renal disease[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(33): 3583-3605.
- SHELTON L M, PARK B K, COPPLE I M. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2013, 84(6): 1090-1095.
- WANG Y, WANG B, DU F, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates oxidative stress and inflammation in obstructive nephropathy via NF-kappaB and Nrf2/HO-1 signaling pathway regulation[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 117(3): 164-172.
- CHUNG S, KIM S, KIM M, et al. T-type calcium channel blocker attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis by activating the Nrf2 antioxidant pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4574-4585.
- KONG W, FU J, LIU N, et al. Nrf2 deficiency promotes the progression from acute tubular damage to chronic renal fibrosis following unilateral ureteral obstruction[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33(5): 771-783.
- TIAN R, YANG W, XUE Q, et al. Rutin ameliorates diabetic neuropathy by lowering plasma glucose and decreasing oxidative stress via Nrf2 signaling pathway in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 771(1): 84-92.
- DOMITROVIC R, JAKOVAC H, VASILJEV M V, et al. Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl(4)-intoxicated BALB/cN mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(10): 1260-1270.