

# 缬草油对高胆固醇血症大鼠肾小球足细胞损伤的影响

司晓芸<sup>1</sup>, 吴小燕<sup>1</sup>, 贾汝汉<sup>2</sup>

(1. 武汉大学中南医院肾内科, 430071; 2. 武汉大学人民医院肾内科, 430060)

**[摘要]** 目的 探讨缬草油对高胆固醇血症大鼠肾小球足细胞损伤的保护作用。方法 大鼠 32 只, 随机分为正常组、高脂组(用含 4% 胆固醇和 1% 胆酸钠的高脂饲料饲喂)、缬草组(缬草油 25 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 灌胃)和他汀组(辛伐他汀 5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 灌胃), 各 8 只。第 8 周和第 16 周时检测各组血脂、尿蛋白、肾功能, 观察肾脏病理学改变, 免疫组化和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肾小球结蛋白(Desmin 蛋白)和 mRNA 表达。结果 缬草油和辛伐他汀均能显著降低大鼠血脂; 8 周时缬草组 24 h 尿蛋白明显降低, 而他汀组 16 周时尿蛋白排泄有所下降。在尿蛋白下降同时, 缬草油能明显改善足细胞超微结构损伤, 减少损伤足细胞数量( $P < 0.01$ ), 下调肾小球内 Desmin 蛋白和 mRNA 表达( $P < 0.01$ ), 其改善作用较辛伐他汀更明显。结论 缬草油可能通过降脂、减轻足细胞损伤、抑制足细胞从基底膜脱落、降低尿蛋白而发挥肾保护作用。

**[关键词]** 缬草油; 高胆固醇血症; 肾小球足细胞; 结蛋白

**[中图分类号]** R285.5; R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2009)09-1117-04

## Effect of Valerian Oil on Podocyte Injury in Hypercholesterolemic Rats

SI Xiao-yun<sup>1</sup>, WU Xiao-yan<sup>1</sup>, JIA Ru-han<sup>2</sup> (1. Department of Nephrology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Nephrology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**ABSTRACT Objective** To evaluate the protective effect of valerian oil on podocyte injury in hypercholesterolemic rats.

**Methods** Dietary-induced hyperlipidemia were established by giving 4% cholesterol and 1% cholic acid diet. 32 SD rats were randomly divided into four groups: hyperlipidemia group, valerian oil (25 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, i. g.) group, simvastatin group (5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, i. g.) and normal control group. Serum lipids, urinary albumin, renal function and renal patho-biology index were assessed at 8 week and 16 week, respectively. The protein expression of desmin in glomeruli was performed by immunohistochemical staining, and the mRNA expression of desmin was detected by RT-PCR at the same time. **Results** The serum levels of total cholesterol, low density lipoprotein were all decreased in valerian group and simvastatin group than those in hyperlipidemia group. Urinary albumin excretion was reduced significantly in valerian group at 8 week, but reduced significantly only at 16 week in simvastatin group. Compared with those in hyperlipidemia group, the podocyte ultrastructure injury, number of damaged podocytes ( $P < 0.01$ ) and expression of desmin protein and mRNA were markedly decreased in valerian group ( $P < 0.01$ ), which was better than those in simvastatin group. **Conclusion** It is concluded that valerian oil has the protective effects on lipid-induced nephropathy by decreasing serum lipid, improving podocyte injury, inhibiting podocyte defluxion from basement membrane and decreasing proteinuria.

**KEY WORDS** Valerian oil; Hypercholesterolemia; Podocyte; Desmin

足细胞结构和功能的完整性是维持肾小球滤过膜功能的关键, 足细胞损伤与多种肾小球疾病有关。研究证实, 足细胞损伤也参与高胆固醇血症肾损害的发生发展<sup>[1]</sup>。缬草为败酱科缬草属的多年生野生植物, 具有广泛突出的药理作用, 近年来研究发现缬草提取物不仅能调节血脂及抗脂质过氧化, 而且对脂质肾损害的进程有延缓作用<sup>[2]</sup>, 但其机制并未完全阐明。笔者采用缬草油预防性治疗实验性高胆固醇血症大鼠, 并观察肾小球内足细胞的变化及其标志蛋白——结蛋白的表达, 以进一步探讨缬草油的可能肾保护机制。

## 1 材料与方法

**1.1 药品与试剂** 胆固醇(武汉亚法生物技术公司), 胆酸钠(北京化学试剂公司), 缬草油(浓度 5 mg · mL<sup>-1</sup>, 华中科技大学同济医学院老年医药学研究所薛存宽教授惠赠)。鼠抗结蛋白单克隆抗体(Desmin, 福州迈新公司)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒(SP Kit, 福州迈新公司)、RNA 提取试剂盒(Trizol, Gibco 公司, 美国), 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(Promega 公司, 英国)。

**1.2 模型制备与动物分组** 12 周龄雌性 SD 大鼠 32 只, 体质量 170 ~ 220 g, 由武汉大学实验动物中心提供。随机分为 4 组: 正常组、高脂组、缬草组和他汀组, 每组 8 只。在大鼠的普通饲料中分别按 4% 和 1% 的比例加入胆固醇和胆酸钠配制成高脂饲料(饲料的可

**[收稿日期]** 2009-04-01 **[修回日期]** 2009-05-08

**[作者简介]** 司晓芸(1972 -), 女, 湖北武汉人, 主治医师, 博士, 主要从事慢性肾衰竭的防治。电话: (0) 15907167296, E-mail: lzgk.lxm@163.com。

溶性蛋白含量 25.0%, 脂肪含量 19.3%), 供高脂组、缬草组、他汀组大鼠自由进食, 正常组大鼠进食普通饲料。缬草组和他汀组大鼠在进食高脂饲料同时, 每日早上固定时间分别给予缬草油 (25 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 和辛伐他汀 (5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 灌胃, 高脂组和正常组给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。分别于第 8 周和第 16 周时处死动物开始有关研究。

1.3 观察指标

1.3.1 血脂、尿蛋白及肾功能测定 血脂: 总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL); Beckman 自动生化分析仪检测; 24 h 尿蛋白 (UPE): 代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 磺基水杨酸法检测尿蛋白; 肌酐清除率 (Ccr): [尿肌酐测定值/标准值 × 24 h 尿量 (mL) × 6.138 9] / 血肌酐测定值。

1.3.2 肾脏病理学观察 1% 戊巴比妥钠溶液 (30 mg · kg<sup>-1</sup>) 腹腔内注射麻醉大鼠, 取肾并称质量。光镜: 部分肾组织置 10% 中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 切片厚 3 μm, 行过碘酸希夫反应 (PAS) 染色后镜检。采用 HPIAS-1000 高清晰度医学彩色病理图像分析系统, 每张标本高倍镜下顺序观察皮质部分 10 个肾小球, 测定肾小球面积 (G, × 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>)、系膜基质面积 (M), 两者之比为系膜基质指数 (M/G)。透射电镜: 部分肾组织预固定 4 h 后, 再固定于 1% 锇酸, Epon812 包埋, 切片厚 50 nm, 铀铅双重染色, 日立 H-500 型透射电镜观察。

1.3.3 足细胞计数 将切片行苏木精-伊红 (HE) 和 PAS 染色, 每张切片随机选取 10 个肾小球, 测量高倍镜下肾小球面积, 同时计数高倍视野每个测量肾小球的足细胞数。计算出每个肾小球每 1 000 μm<sup>2</sup> 面积内肾小球足细胞数, 取平均值代表肾小球足细胞数目。

1.3.4 肾小球 Desmin 蛋白表达 切片厚 3 μm, 根据

免疫组织化学 (SP) 试剂盒所示方法检测, 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性结果, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照。HPIAS-1000 型医学彩色病理图像分析系统行半定量分析, 用积分吸光度表示阳性物质的相对含量。

1.3.5 肾皮质 Desmin mRNA 表达 RT-PCR 法检测。Trizol 试剂提取肾皮质总 RNA, 反转录制备 cDNA。总反应体积 50 μL, RNA 5 μL, 上下游引物各 1 μL。以 GAPDH 为内参照进行 PCR 扩增。Desmin 引物: 上游 5'-GCTTCGCCAACTACT TCGAG-3'; 下游 5'-GTGAGGCTCTGGCTTGACAT-3'; 扩增产物片段为 441 bp; GAPDH 引物: 上游 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'; 下游 5'-AGATCCACA ACGGATACATT-3'; 扩增产物片段为 308 bp。PCR 扩增条件: 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 32 次循环后, 再行 72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 5 μg · mL<sup>-1</sup> 溴化乙啶染色, SX-100 凝胶图像处理系统分析产物的量。

1.4 统计学方法 计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, SPSS13.0 软件进行方差分析和 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂、尿蛋白和肾功能 缬草组和他汀组血 TC 和 LDL 较高脂组明显降低, 但仍然高于正常组, TG 和 HDL 各组间治疗前后无明显变化。8 周时缬草组 UPE 较高脂组显著下降 (P < 0.01), 而他汀组 UPE 与高脂组比较差异无显著性。16 周时缬草组和他汀组 UPE 均较高脂组明显下降, 以缬草组下降更显著, 与他汀组比较差异有显著性 (P < 0.05)。16 周时缬草组 Ccr 较高脂组轻度升高, 但各组间差异无显著性。见表 1。

表 1 4 组大鼠血脂、尿蛋白、肾功能测定结果比较

组别与时间	大鼠/ 只	TC/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	LDL/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	UPE/ mg	Ccr/ (mL · min <sup>-1</sup> )
缬草组	8				
第 8 周		2.27 ± 0.26 <sup>*1*2</sup>	1.05 ± 0.13 <sup>*1</sup>	9.25 ± 2.41 <sup>*1*2</sup>	1.30 ± 0.28
第 16 周		2.99 ± 0.36 <sup>*1</sup>	1.15 ± 0.14 <sup>*1</sup>	11.09 ± 2.15 <sup>*1*2</sup>	1.05 ± 0.27
他汀组	8				
第 8 周		1.96 ± 0.19 <sup>*1</sup>	0.86 ± 0.19 <sup>*1</sup>	16.21 ± 5.74	1.21 ± 0.37
第 16 周		2.62 ± 0.24 <sup>*1</sup>	0.95 ± 0.11 <sup>*1</sup>	14.15 ± 2.76 <sup>*1</sup>	0.98 ± 0.24
高脂组	8				
第 8 周		4.43 ± 0.38	1.65 ± 0.31	18.26 ± 6.46	1.19 ± 0.31
第 16 周		6.56 ± 1.11	2.68 ± 0.77	25.74 ± 5.05	1.00 ± 0.29
正常组	8				
第 8 周		1.11 ± 0.17	0.41 ± 0.12	6.07 ± 1.61	1.44 ± 0.35
第 16 周		1.43 ± 0.16	0.39 ± 0.08	7.35 ± 1.18	1.23 ± 0.30

与高脂组同时间比较, <sup>\*1</sup>P < 0.01; 与他汀组同时间比较, <sup>\*2</sup>P < 0.05

**2.2 病理学观察** 光镜下正常大鼠肾小球结构清楚, 细胞数和系膜基质无增多; 高脂大鼠多数肾小球系膜基质中重度增多, 基底膜中重度不规则增厚, 肾小球局部空泡形成, 偶见肾小球局灶节段性硬化; 缬草组和他汀组上述病理改变较高脂组减轻, 以缬草组改善更明显, 肾小球系膜基质指数也明显低于高脂组。电镜下正常大鼠足细胞结构完整, 足突排列整齐清晰; 而高脂大鼠肾小球足细胞浓缩, 脂滴出现, 胞核不规则, 足突增粗、弯曲、倒伏、融合; 缬草组足细胞病变较高脂组明显减轻, 他汀组病变有所减轻。

**2.3 足细胞计数** 高脂组肾小球足细胞数明显下降, 缬草组和他汀组足细胞数较高脂组增加, 以缬草组增加更明显 ( $P < 0.01$ )。

**2.4 肾小球 Desmin 蛋白表达** 正常大鼠肾小球内偶见散在 Desmin 蛋白表达, 高脂组大鼠肾小球内 Desmin 蛋白表达明显增多; 缬草组和他汀组肾小球内 Desmin 蛋白表达量较高脂组有所下降, 组间比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.5 肾皮质 Desmin mRNA 表达** 高脂组 Desmin mRNA 表达最为丰富, 缬草组 Desmin mRNA 表达较高脂组明显减弱 ( $P < 0.01$ ), 他汀组表达有所减弱 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3 讨论**

缬草主要含有环烯醚萜、倍半萜、生物碱和黄酮四大类型化学成分, 生物碱和黄酮多存在于缬草地上部分, 环烯醚萜和倍半萜则多存在于缬草根部分。缬草的主要有效部位在缬草鲜根萃取的挥发油与非挥发性酯类, 挥发油中单萜及倍半萜的含氧衍生物约占油全量的 55%, 是挥发油中的主要活性组分<sup>[3]</sup>, 其药理作用并未完全阐明。本实验结果显示, 缬草油能显著改善高脂大鼠脂代谢紊乱, 其降脂效果与临床常用降脂药辛伐他汀类似。在血脂下降同时, 大鼠的尿蛋白减少、系膜细胞和基质增生减轻、肾小球系膜基质指数明显降低, 表明降脂治疗是缬草油发挥肾保护作用的机制之一。与辛伐他汀相比, 缬草油对尿蛋白排泄、系膜细胞和基质增生的改善作用更为明显, 推测缬草油除降

脂外, 尚可能通过其他环节发挥肾保护作用。

近年研究表明, 肾小球足细胞形态学变化涉及蛋白尿的发生和肾脏疾病的进展。足细胞是肾小球中体积最大、功能最复杂的一类细胞, 高度分化, 自出生后一般不再进行分裂。足细胞是构成肾小球滤过屏障的主要成分, 胞体伸出许多足突形成拉链式结构, 覆盖于肾小球基底膜, 足突间的裂孔膜以大小选择性方式来限制血浆蛋白进入尿道, 构成了阻止蛋白从尿道丢失的最后屏障。而且, 足细胞在稳定肾小球毛细血管袢、调节超滤系数以及保持肾小球基底膜的正常形态中也有重要作用<sup>[4]</sup>。当足细胞受到损伤时, 足突的正常结构破坏、消失, 足细胞从基底膜脱离, 由于其增殖能力有限, 不能有效覆盖基底膜, 滤过膜完整性破坏, 可导致蛋白尿发生。同时, 足细胞数量和密度的减少, 改变了滤过屏障的正常结构, 造成肾小球基底膜裸露, 足突与肾小球包曼氏囊壁发生粘连, 启动肾小球硬化。足细胞缺失与肾小球硬化的发生密切相关, 研究表明, 当足细胞数减少 10% ~ 20% 时, 即开始出现肾小球硬化过程<sup>[5]</sup>。本实验中, 高脂大鼠超微结构下足细胞足突增粗、弯曲、倒伏、融合, 足细胞数量明显下降; 缬草油治疗后肾小球内足细胞病变减轻、数量明显增加, 同时伴尿蛋白减少、基质增生和硬化延缓。推测缬草油可能通过减轻足细胞损伤、抑制足细胞从基底膜脱落、降低尿蛋白而发挥肾保护作用。

足细胞是分化成熟的细胞, 增生能力有限, 当受到损伤时, 会发生一系列的表型改变而产生大量细胞外基质 (ECM) 成分, 加速肾硬化进程。Desmin 为 O-唾液酸糖蛋白家族成员, 是细胞骨架中间丝蛋白的一种, 以往常作为肌源性细胞的标志, 在肾小球滤过功能中的作用尚不清楚, 有学者推测其参与 Nephron 蛋白复合体形成。研究证明正常情况下肾小球系膜细胞可偶见 Desmin 少量表达, 而足细胞无明显表达, 当足细胞因各种原因发生损伤时, 细胞骨架重新排列, 可大量表达 Desmin 而发生表型转化, 因此 Desmin 可作为光镜下足细胞损伤的标志<sup>[6]</sup>。本实验中, 高脂大鼠在足细胞超微结构损伤和数量减少的同时, 肾小球内 Desmin 蛋白

表 2 各组大鼠肾小球病理改变和 Desmin 表达

组别	大鼠/ 只	M/G	足细胞计数/ ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) <sup>-1</sup>	Desmin 蛋白	Desmin mRNA
缬草组	8	0.34 ± 0.05 <sup>*1</sup>	10.46 ± 1.30 <sup>*1*2</sup>	1.41 ± 0.26 <sup>*1*2</sup>	0.76 ± 0.11 <sup>*1*2</sup>
他汀组	8	0.39 ± 0.07 <sup>*3</sup>	8.26 ± 1.19 <sup>*3</sup>	2.13 ± 0.38 <sup>*3</sup>	1.24 ± 0.15 <sup>*3</sup>
高脂组	8	0.47 ± 0.06	6.83 ± 1.17	3.08 ± 0.33	1.88 ± 0.14
正常组	8	0.26 ± 0.06	12.51 ± 1.22	0.89 ± 0.05	0.35 ± 0.10

与高脂组比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*3</sup> $P < 0.05$ ; 与他汀组比较, <sup>\*2</sup> $P < 0.05$

和 mRNA 表达明显上调,而缬草油能显著降低 Desmin 表达;随 Desmin 表达减少,尿蛋白和病理学改变明显改善。提示缬草油不仅通过改善足细胞结构损伤延缓肾损害,还可能通过抑制足细胞表型转化、降低 ECM 表达抑制肾组织硬化和纤维化。

[DOI] 10.3870/ydyb.2009.09.005

[参考文献]

[1] 司晓芸,贾汝汉,黄从新,等.肾小球足细胞损伤在脂质肾损害发病中的作用[J].广西医科大学学报,2002,19(2):157-160.

[2] 司晓芸,贾汝汉,黄从新,等.宽叶缬草对高脂血症大鼠肾小球 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响[J].医药导报,2003,22(4):222-224.

[3] 张振学,姚新生.药用植物缬草的化学研究进展[J].中国药物化学杂志,2000,10(3):226-230.

[4] SUN Y, HE L, TAKEMOTO M, et al. Glomerular transcriptome changes associated with lipopolysaccharide-induced proteinuria[J]. *Am J Nephrol*, 2009, 29(6): 558-570.

[5] MACCONI D, SANGALLI F, BONOMELLI M, et al. Podocyte repopulation contributes to regression of glomerular injury induced by ACE inhibition[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3): 797-807.

[6] LI Y, KANG Y S, DAI C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 299-308.

## $\gamma$ -氨基丁酸对慢性肾衰竭大鼠肾小管间质纤维化的抑制作用

梁萍萍,位红兰,李娣昕,刘慎微

(华中科技大学同济医学院附属同济医院肾内科,武汉 430030)

[摘要] 目的 建立大鼠慢性肾衰竭模型,观察 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)对慢性肾衰竭大鼠肾小管间质纤维化的抑制作用并对其机制进行研究。方法 5/6肾切除法建立慢性肾衰竭大鼠模型,大鼠随机分为3组:对照组,慢性肾衰竭组(模型组),慢性肾衰竭GABA给药组(治疗组)。手术后60d处死各组大鼠,测定各组大鼠血清尿素氮和肌酐水平,观察第60天肾脏组织病理改变,免疫组化法检测肾组织转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、基质金属蛋白酶抑制物-1(TIMP-1)的表达,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测肾组织TIMP-1 mRNA的表达水平。结果 与模型组比较,治疗组大鼠肾功能改善,残肾组织肾小管萎缩及肾小管间质纤维化减轻,而肾小球硬化改变不明显。结论 GABA可以通过抑制肾小管间质纤维化和肾小管萎缩,改善5/6肾切除肾衰竭大鼠的肾功能。

[关键词]  $\gamma$ -氨基丁酸;肾衰竭,慢性;肾小管间质纤维化;肾小管萎缩

[中图分类号] R977;R692.5 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2009)09-1120-04

### $\gamma$ -Aminobutyric Acid Inhibits Progression of Tubular Interstitial Fibrosis in Rats with Chronic Renal Failure

LIANG Ping-ping, WEI Hong-lan, LI Di-xin, LIU Shen-wei (Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To study the effects and mechanism of GABA on tubular interstitial fibrosis in chronic renal failure rats. **Methods** The model of chronic renal failure was induced by 5/6 nephrectomy in rats. The nephrectomized rats were randomly allocated to the GABA treatment group and model group. The rats with sham operation served as control. BUN and Scr were determined, and renal pathological changes were evaluated at the 60th day after operation. Immunohistochemistry was used to examine the expression of TGF- $\beta_1$  and TIMP-1 and RT-PCR was applied to test the mRNA expression of TIMP-1.

**Results** Compared with the model group, the renal function in GABA treatment group was ameliorated, the tubular interstitial fibrosis and atrophy were lessened significantly, while the effects on glomeruli were less. **Conclusion** GABA may have a beneficial effect on renal function in nephrectomized rats by inhibiting fibrosis and atrophy primarily in tubuli and tubular interstitium.

**KEY WORDS**  $\gamma$ -aminobutyric acid; Renal failure, chronic; Tubular interstitial fibrosis; Tubular atrophy