灯盏花素对肾损害小鼠肾组织细胞凋亡及相关蛋白的影响

徐华[1,2],常陆林[2],马天江[1,2],娄晓宇[1],任亮[2*]
(1. 漯河市第一人民医院,河南 漯河 462001; 2. 漯河医学高等专科学校,河南 漯河 462002)

[摘要] **目的**:观察灯盏花素对顺铂致小鼠肾损害肾组织细胞凋亡及相关蛋白的影响。**方法**:将昆明种小鼠随机分为对照组、模型组、灯盏花素 25,50 mg·kg^{-1}组。除对照组外,其余各组腹腔注射顺铂 8 mg·kg^{-1}制备小鼠肾损害模型,灯盏花素组分别灌胃给药,连续 7 d。给药结束后收集小鼠尿液进行尿蛋白(Upr)/尿肌酐(Ucr)及 *N*-乙酰-*β*-*D*-氨基葡萄糖苷酶(NAG-U)测定。原位末端标记法(TUNEL)检测小鼠肾脏细胞凋亡状况,免疫组化法检测肾脏相关凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达。**结果**:模型组小鼠 Upr/Ucr 及 NAG-U 较对照组明显升高,肾组织的凋亡指数增加,肾组织细胞凋亡蛋白 Bax 及 Bcl-2 表达增强,Bax/Bcl-2 比值升高($P<0.05$,$P<0.01$),而 2 个灯盏花素实验组 Upr/Ucr、NAG-U 较模型组明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),其中灯盏花素 50 mg·kg^{-1}小鼠较模型组肾组织细胞凋亡指数、Bax 表达、Bax/Bcl-2 减少,Bcl-2 的表达增强($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论**:Upr/Ucr 与 NAG-U 可作为顺铂肾损害的评估指标。灯盏花素减轻顺铂肾损害的机制可能与增强凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达,降低 Bax 表达及 Bax/Bcl-2 的比值有关。

[关键词] 灯盏花素; 顺铂; 肾损害; 凋亡; 蛋白
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)06-0260-04

Effects of Breviscapine on Renal Cell Apoptosis and Expression of Apoptosis-related Proteins in Mice with Cisplatin-induced Nephrotoxicity

XU Hua[1,2], *CHANG Lu-lin*[2], *MA Tian-jiang*[1,2], *LOU Xiao-yu*[1], *REN Liang*[2*]
(1. *Luohe Frist People's Hospital*, *Luohe* 462001, *China*; 2. *Luohe Medical College*, *Luohe* 462002, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effects of breviscapine on renal cell apoptosis and expression of apoptosis-related proteins in mice with cisplatin-induced nephrotoxicity. **Method**: Kunming mice were randomly divided into four groups: control group, model group, breviscapine experimental groups by 25 mg·kg^{-1}or 50 mg·kg^{-1}. Three groups were given a single injection of cis-platinum complexes (CDDP) to establish the model of renal injury (8 mg·kg^{-1}, ip) except the control group, then the mice in two breviscapine experimental groups were given different dose (25, 50 mg·kg^{-1}, ig) once a day for seven days. The urine samples were collect for measuring Urine protein (Upr) /Urine creatinine (Ucr) and *N*-aletyl-beta-*D*-glucosaminidase (NAG-U). Apoptosis of the renal cells were determined by TUNEL method, also the expression of Bax and Bcl-2 was evaluated by immunohistochemical SP method after the mice were sacrificed. **Result**: The Upr/Ucr ratio, NAG-U in the model group were higher than those in the control group, but they were significantly lower in two breviscapine groups ($P<0.05$, $P<0.01$), also apoptosis index of the renal cells, the expression of Bax and Bcl-2, the Bax/Bcl-2 ratio in the model group were higher than those in the control group. But, in the breviscapine experimental group of 50 mg·kg^{-1}, apoptosis index was significantly declined ($P<0.05$, $P<0.01$), the expression of Bcl-2 was increased, the expression of Bax was declined, the Bax/Bcl-2 ratio was declined compared with those in model group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion**: The Upr/Ucr ratio and NAG-U might be useful for evaluating renal

[收稿日期] 20120702(012)
[基金项目] 漯河市科技发展计划项目(2011-206-07);漯河医专 2011 年度科研课题(2011S04)
[第一作者] 徐华,副主任药师,从事肿瘤药理学研究,Tel:13939559686,E-mail:renliang3008@126.com
[通讯作者] *任亮,副教授,从事肿瘤药理学及中药药理学研究,Tel:15939520039,E-mail:renliang3008@163.com

injury induced by CDDP. Breviscapine could suppress renal cell apoptosis induced by CDDP and protect renal from injury by means of increasing the expression of *Bcl*-2 and declining the expression of Bax and Bax/Bcl-2 ratio.

[**Key words**] breviscapine; cisplatin; nephrotoxicity; apoptosis; protein

顺铂(CDDP)是一线抗癌药,但剂量依赖性的肾损害限制了其临床应用。有报道指出,使用单一剂量顺铂治疗后大约25% ~30% 的患者出现不同程度的肾损害[1]。因此如何有效防治顺铂的肾损害成为临床关注的重要问题。有证据表明肾脏细胞的凋亡与多种肾脏疾病的发生、发展及修复过程有关[2]。灯盏花素(Bre)的主要成分是黄酮类化合物,可增加脏器的血流量,改善微循环,抑制血小板聚集[3],在防治多种急慢性肾脏疾病方面显示较好的临床应用[4-5]。本研究通过观察灯盏花素对顺铂肾损害小鼠肾组织细胞凋亡及相关凋亡蛋白表达的影响,探讨灯盏花素防治顺铂肾毒性的机制。

1 材料

1.1 仪器、药品与试剂 752N-型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TL80-1 型医用离心机(江苏姜堰天力器械有限公司);AU-2700 型全自动生化分析仪,BX-40 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司);HPIAS-21000 型彩色病理分析系统(华中科技大学同济医学院千屏影像工程公司)。灯盏花素冻干粉,湖南恒生制药有限公司,批号20100403;顺铂冻干粉,山东齐鲁制药厂,批号908027CF;TUNEL 试剂,武汉博士德生物工程有限公司,批号 100523;尿蛋白(Upr)检测试剂盒、尿肌酐(Ucr)检测试剂盒、*N*-乙酰-*β*-*D*-氨基葡萄苷酶检测试剂盒(批号为 091116,100320,100415),均由南京建成生物工程有限公司提供;兔抗 Bax 和 Bcl-2 多克隆抗体及 SP 法二抗试剂盒(批号为 100520,100512,100516),均由北京中山试剂公司提供,其他试剂均为分析纯。

1.2 动物 昆明种小鼠,SDF 级,雌雄兼用,体重18 ~22 g,河南医学实验动物中心(医动字第 410115 号),实验前置代谢笼收集小鼠尿液,检测 Up,Ucr 及 NAG-U 均无异常。

2 方法

2.1 分组及给药 将 40 只小鼠按照体重不同随机分为 4 组:对照组:常规喂养,给予 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液灌胃;模型组:顺铂用生理盐水稀释后以 8 $mg\cdot kg^{-1}$单次腹腔注射制备小鼠顺铂肾损害模型,造模后给予 0.5% CMC-Na 溶液灌胃;25 $mg\cdot kg^{-1}$灯盏花素组:造模后给予灯盏花素 25 $mg\cdot kg^{-1}$,灌胃;50 $mg\cdot kg^{-1}$灯盏花素组:造模后给予灯盏花素 50 $mg\cdot kg^{-1}$灌胃。所有动物造模完成当日开始给药,给药容积均为0.01 $mL\cdot g^{-1}$,1 次/d,连续 7 d。

2.2 小鼠肾脏 Upr/Ucr 及 NAG-U 的检测 造模第 8 天将各组小鼠置小鼠代谢笼中收集 24 h 尿液,稀释至约 2 mL 左右(各组尿液稀释倍数相同),采用全自动分析仪进行 Upr/Ucr 及 NAG-U 的测定。

2.3 小鼠肾组织细胞凋亡检测 采用 TUNEL 法按试剂盒说明操作进行。取小鼠肾脏后以 10% 福尔马林固定,脱水后石蜡包埋制备石蜡切片,切片脱蜡后采用荧光素标记,用结合过氧化物酶的抗荧光素抗体与荧光素结合,再与底物 DAB 进行显色反应,脱水、透明、封片。细胞核呈棕色的细胞为凋亡阳性细胞。每组随机取 10 张切片,每张切片在高倍镜下(×400)随机观察 5 个不重叠视野,计算阳性细胞数和总细胞数的比值,取其平均值为凋亡指数。

2.4 小鼠肾组织中凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达 采用 SP 法进行检测。将肾组织切片厚约4 μm,脱蜡水化,一抗为兔抗鼠 Bax 或 Bcl-2 多克隆抗体,二抗为羊抗兔 IgG,以 PBS 代替一抗作阴性对照,DAB 显色,胞质呈棕色颗粒的细胞为阳性表达细胞。每组 10 张切片,每张切片在高倍镜下(×400)随机选择 5 个不重叠视野,采用 HPIAS21000 高清晰彩色病理图文分析系统,以平均吸光度(阳性细胞着色深浅)表示 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对顺铂肾损害小鼠肾脏 Upr/Ucr 及 NAG-U 的影响 由表 1 可知,模型组小鼠肾脏的 Upr/Ucr 和 NAG-U 活性与对照组显著升高,具有统计学意义($P<0.01$),灯盏花素 25,50 $mg\cdot kg^{-1}$实验组小鼠肾脏的 Upr/Ucr 和 NAG-U 活性与模型组比较有所降低,具有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),且变化呈现同步性。说明 Upr/Ucr 与 NAG-U 均可作为实验中评估顺铂肾损害小鼠肾功能的指标,同时也说明灯盏花素可减轻顺铂引起的小鼠肾损害作用。

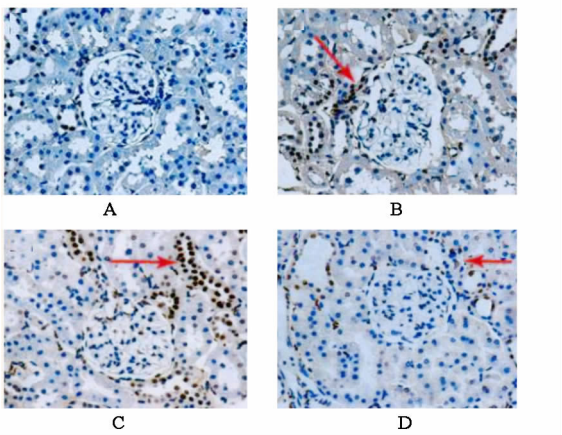
3.2 对顺铂肾损害小鼠肾组织细胞凋亡的影响

表 1　灯盏花素对顺铂肾损害小鼠肾脏 Upr/Ucr 及 NAG-U 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg^{-1}	Upr/Ucr /%	NAG-U /U
对照	–	0.58 ± 0.29	58.70 ± 2.60
模型	–	0.79 ± 0.52$^{2)}$	80.50 ± 5.26$^{2)}$
灯盏花素	25	0.64 ± 0.34$^{1,3)}$	67.33 ± 2.16$^{1,3)}$
	50	0.58 ± 0.17$^{4)}$	55.13 ± 2.30$^{4)}$

注：与对照组比较$^{1)}$ $P < 0.05$，$^{2)}$ $P < 0.01$；与模型组比较$^{3)}$ $P < 0.05$，$^{4)}$ $P < 0.01$（表 2 同）。

由图 1 可知，对照组小鼠肾脏几乎未见细胞凋亡，而模型组及灯盏花素 25，50 mg·kg^{-1}实验组小鼠肾脏细胞凋亡明显增多，以肾小管与集合管较为明显。由表 2 可知，模型组小鼠肾组织细胞凋亡指数较对照组明显增加，具有统计学意义（$P < 0.01$），灯盏花素 50 mg·kg^{-1}实验组肾组织细胞凋亡指数较模型组明显降低，具有统计学意义（$P < 0.05$）。提示顺铂的肾损害作用与肾小管细胞凋亡有关，而灯盏花素可能具有降低顺铂肾损害肾组织的凋亡作用。



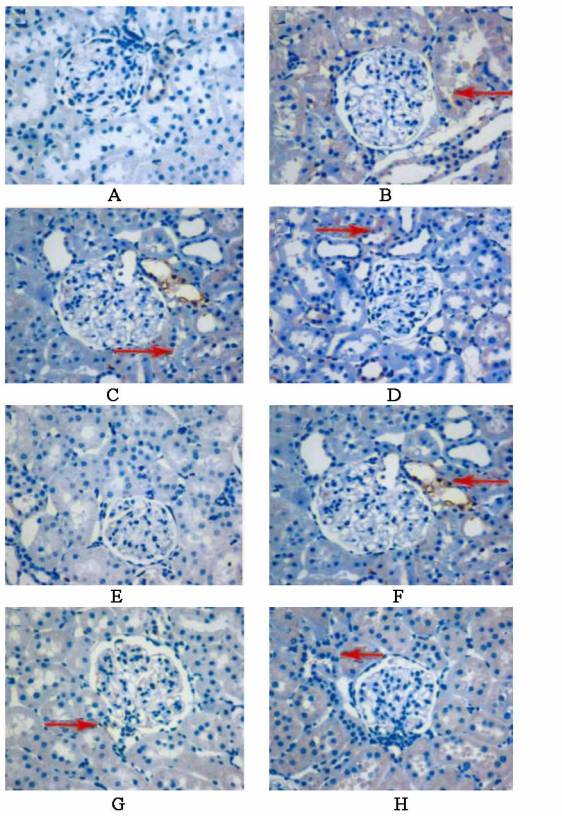
A. 对照组；B. 模型组；
C. 灯盏花素 25 mg·kg^{-1}；D. 灯盏花素 50 mg·kg^{-1}

图 1　灯盏花素对顺铂肾损害小鼠肾组织细胞凋亡的影响（TUNEL，×400）

表 2　灯盏花素对顺铂肾损害小鼠肾组织细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

组别	剂量 /mg·kg^{-1}	凋亡指数 /%
对照	–	10.0 ± 1.6
模型	–	40.7 ± 8.4$^{2)}$
灯盏花素	25	36.9 ± 6.9$^{2)}$
	50	27.6 ± 4.5$^{1,3)}$

3.3　对顺铂肾损害小鼠肾组织中凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响　由图 2 可知，对照组小鼠肾组织中凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达均较少，而模型组及灯盏花素 25，50 mg·kg^{-1}实验组小鼠肾组织中凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 明显增多，且以肾小管表达为主。模型组小鼠肾脏 Bax 及 Bcl-2 表达较对照组小鼠增加，Bax/Bcl-2 升高，具有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$），灯盏花素 50 mg·kg^{-1}实验组小鼠与模型组比较，肾小管细胞 Bax 表达减弱，而 Bcl-2 表达有所增强，Bax/Bcl-2 比值降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。提示灯盏花素可能通过降低 Bax/Bcl-2，调节 Bcl-2 蛋白家族的表达水平发挥其抑制细胞凋亡的作用。见表 3。



A，E. 对照；B，F. 模型；C，G. 灯盏花素 25 mg·kg^{-1}；
D，H. 灯盏花素 50 mg·kg^{-1}（A ~ D. 表达情况，
E ~ H：Bcl-2 表达情况）

图 2　灯盏花素对顺铂肾损害小鼠肾组织中凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响（SP，×400）

4　讨论

顺铂肾毒性的机制目前尚不清楚，有研究表明，顺铂肾毒性的机制可能与脂质过氧化反应增强、诱导肾小管细胞凋亡等因素有关[6]。其中氧化应激反应及其代谢产物可直接损伤细胞核酸、蛋白质、黏多糖等，因此，24 h 尿蛋白排泄率是临床反映肾损害的重要指标之一，与肾损害呈正相关性[7]。但对

表 3　灯盏花素对顺铂肾损害小鼠肾组织中凋亡蛋白 Bax 及 Bcl-2 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

组别	剂量 /mg·kg^{-1}	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2 /%
对照	–	2.5 ± 0.6	3.8 ± 0.6	0.6 ± 0.4
模型	–	7.0 ± 0.3$^{2)}$	4.5 ± 1.3$^{1)}$	2.0 ± 0.9$^{2)}$
灯盏花素	25	6.6 ± 1.0$^{2)}$	4.9 ± 0.5$^{2)}$	1.8 ± 0.4$^{2)}$
	50	5.5 ± 0.9$^{2,3)}$	5.3 ± 2.1$^{2,3)}$	1.0 ± 0.8$^{1,3)}$

于动物实验而言,收集小鼠 24 h 尿液标本非常繁琐费时,且不易定量。因此,在本研究中选择 Upr/Ucr 的方法评估顺铂肾损害的程度,并以 NAG 酶值作为参照。Upr/Ucr 数值的变化说明,一次尿液 Upr/Ucr 可以较好反映肾功能受损情况,具有简单和方便的特点,可以作为动物实验反映肾损害的指标。同时也说明灯盏花素能修复肾小球滤过的屏障,促进肾小管的重吸收,对顺铂损伤后的肾脏具有良好的保护作用。

研究表明,脂质过氧化反应还可以通过多种途径激活肾脏细胞凋亡信号传导通路,引起细胞凋亡,从而导致肾小管细胞、肾小球及肾实质细胞损害和坏死,产生急性肾功能损害。因此 CDDP 诱导细胞凋亡可能亦是 CDDP 肾毒性的重要机制之一[8]。在细胞的凋亡过程中,Bcl-2 是家族中重要的细胞凋亡负调节因子之一,其生理功能是阻遏细胞凋亡,延长细胞寿命。Bax 是 Bcl-2 家族中参与细胞凋亡的一个成员,可以对抗 Bcl-2 的凋亡抑制作用。而 Bax/Bcl-2 是调节细胞的关键,两者比值增加可促进细胞凋亡,反之则抑制细胞凋亡[9]。本研究中,CDDP 可引起肾小管细胞凋亡指数增加,引起凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 增加明显,也证明了上述观点。

关于灯盏花素的抗肿瘤作用以及对 CDDP 肾毒性的防治作用及抗氧化作用,在之前的实验中已经得到证实[6,10],但灯盏花素是否对肾小管细胞凋亡具有保护作用,其抗凋亡机制与凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 有关,尚不明确。龚明玉等发现灯盏花素对缺血再灌注大鼠的心肌细胞具有抗凋亡作用[11],而我们亦发现灯盏花素对顺铂肾损害肾小管细胞凋亡具有保护作用,且 50 mg·kg^{-1}灯盏花素可使顺铂肾损害小鼠肾小管细胞 Bax 蛋白表达减弱,而 Bcl-2 蛋白表达明显增强,Bax/Bcl-2 显著降低,说明灯盏花素对 CDDP 肾毒性的保护作用的机制可能与影响细胞凋亡及降低凋亡基因 Bax/Bcl-2 有关。但灯盏花素是通过哪些途径影响 Bax 与 Bcl-2 等凋亡基因,从而调节肾组织细胞凋亡通路的,还需要进一步地研究。

[参考文献]

[1] 胡全,张现慧,耿宝琴,等.氨磷汀预防顺铂所致肾毒性[J].中国现代应用药学杂志,2008, 25(5):382.

[2] Rana A, Sathyanarayana P, Lieberthal W. Role of apoptosis of renal tubular cells in acute renal failure: therapeuticimplications [J]. Apoptosis, 2001, 6 (1/2):83.

[3] 张滨斌,李燕,于维霞,等.生脉注射液联合灯盏花素注射液治疗椎基底动脉供血不足[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):285.

[4] 亓翠玲,亓立勇.灯盏花素治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].实用糖尿病杂志,2006, 2(1):23.

[5] 郑学良.灯盏花素配合西药治疗高血压肾病疗效观察[J].实用中医药杂志,2006,22(3): 144.

[6] 任亮,张印坡,徐华,等.灯盏花素对小鼠顺铂肾损害的防治作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):162

[7] 贺丹,柴华旗,黎曼.晨尿尿蛋白/尿肌酐比和 24 h 尿蛋白定量的临床评价[J].苏州大学学报:医学版,2004,24(6):861.

[8] 席加喜,刘晓霞,杨玉芳,等.血栓通对顺铂肾损伤大鼠的肾功能和氧化指标的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):227.

[9] 刘瑾.白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性肝癌肿瘤组织 Bcl-2,Bax 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):227.

[10] 任亮,马菲,李晓莉,等.灯盏花素增强马利兰抑制 HL-60 细胞作用的实验研究[J].中国药房,2010,21(7):1749.

[11] 龚明玉,张力,杜超,等.灯盏花素对缺血再灌注大鼠心肌超微结构及细胞凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):147.

[责任编辑　李玉洁]