

扶正解毒颗粒对染镍大鼠肾组织核因子-κB 活化的影响

滕玉莲^{1*}, 吕晓云², 赵健雄²

(1. 兰州大学校医院, 兰州 730000; 2. 兰州大学中西医结合研究所, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究中药扶正解毒颗粒(FJG)对硫酸镍(NiSO₄)染毒大鼠肾组织核因子-κB (NF-κB)活化的影响。方法:50 只 Wistar 大鼠采用 NiSO₄ 2.5 mg·kg⁻¹ ip(连续 7 d,此后间日 1 次)制备肾损伤模型,随机分为 NiSO₄ 组(模型组)、FJG 高、中、低剂量组(分别为 20,10,5 g·kg⁻¹·d⁻¹),二巯基丁二酸(DMSA),50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组。另设 NS 组(空白对照)及 FJG 对照组(FJG 10 g·kg⁻¹·d⁻¹)。各组大鼠 ig 1 次/d,共 4 周。测定各组大鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)及 24 h 尿蛋白定量(24 h-UP),免疫组化 SP 法观察肾组织 NF-κB 活化。结果:NiSO₄ 组大鼠出现肾功能损伤,NF-κB 活化:肾小球(34.62±9.11)%,肾小管(62.45±14.78)%;FJG 大剂量组 NF-κB 活化:肾小球(2.08±0.64)%,肾小管(11.48±3.39)%,明显低于 NiSO₄ 组(P<0.01),肾功能损伤亦明显减轻(P<0.05,P<0.01)。结论:FJG 可能通过抑制肾组织 NF-κB 活性的异常升高而发挥拮抗镍性肾损伤的作用。

[关键词] 扶正解毒颗粒;硫酸镍;肾脏;核因子-κB

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0150-03

Effects of Fuzheng Jiedu Granula on the Activation of NF-κB in Rats Exposed to Nickel

TENG Yu-lian^{1*}, LV Xiao-yun², ZHAO Jian-xiong²

(1. School Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000 China; 2. Institute of Integrated Traditional Chinese Medicine with West Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] Objective: To study the effects of Fuzheng Jiedu Granula (FJG) on the activation of nuclear factor-kappa-B (NF-κB) in rats exposed to nickel (nickel sulfate, NiSO₄). Method: Rat nephrotoxicity model was established by intraperitoneal injection of NiSO₄ (2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹). They were randomized into 5 groups, model group, FJG high dose group (20 g·kg⁻¹·d⁻¹), FJG middle dose group (10 g·kg⁻¹·d⁻¹), FJG, low dose group (5 g·kg⁻¹·d⁻¹), meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) group (0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹). Twenty Wistar rats were randomly divided into NS group and FJG control group (10 g·kg⁻¹·d⁻¹). Rats in each group were treated by intragastric administration once every day for four weeks. The levels of blood ureanitrogen (BUN), Creatinine (Scr) and 24 hours-proteinuria (24 h-UP) were measured. The activation of NF-κB was measured with immunohistochemistry methods. Result: In FJG groups, the levels of BUN, Scr, 24h-UP and the activation of NF-κB were all decreased (P<0.05, P<0.01), compared with that of NiSO₄ group. Conclusion: Inhibiting the activation of NF-κB, FJG could protect renal from injury induced by nickel.

[Key words] Fuzheng Jiedu granula; nickel sulfate; kidney; nuclear factor-kappa-B

[收稿日期] 20110720(007)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金研究基金计划项目(096RJZA060);兰州大学医学科研基金资助项目(LZUYX200805)

[通讯作者] *滕玉莲, Tel: 13669365605, E-mail: tengyl2011@126.com

镍化合物是一多器官毒物,可累及肝、肾、肺及心血管、血液等系统^[1]。肾脏为镍蓄积、排泄以及毒性作用的重要靶器官^[2]。研究表明,中药扶正解毒颗粒(Fuzheng Jiedu granula, FJG)对硫酸镍(NiSO₄)毒性有较好的拮抗作用^[3]。本研究通过观察 FJG 对 NiSO₄ 染毒大鼠肾组织核因子-κB (NF-

κB)活化的影响,研究 FJG 对镍性肾损伤的干预作用,旨在进一步为 FJG 的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wista 大鼠 70 只,雌雄各半,体重(180 ± 20) g,由兰州大学医学实验动物中心提供(甘动准 14-006)。

1.2 药物及试剂 扶正解毒颗粒(FJG)由红芪、当归、枸杞、丹参、茯苓等中药组成,甘肃省食品药品监督管理局批准(甘药制字 Z07031625),兰州太宝制药有限公司生产。NiSO₄ 为分析纯,含量 > 99% (西安化学试剂厂);二巯基丁二酸(meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid,DMSA,美国 Sigma 公司);尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)、尿蛋白试剂盒(南京建成生物工程研究所);小鼠抗大鼠 NF-κB p65 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,武汉博士德工程有限公司分装);免疫组化检测试剂盒(武汉博士德工程有限公司)。

1.3 仪器 GL6-HPIAS 高清晰度彩色病理图文分析系统(东方德公司)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 70 只大鼠称重后随机分为 7 组,每组 10 只。生理盐水(NS)组:NS ip,每天 0.5 mL/只 ig,并同时处死,作空白对照;FJG 对照组:NS ip,以 FJG 10 g · kg⁻¹ · d⁻¹ (以生药计)ig 处理;NiSO₄ 组:NiSO₄ 2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ ip,连续 7 d,此后间日 1 次,同时每天 NS 0.5 mL/只 ig,直至处死;FJG 高、中、低剂量组:染毒与 NiSO₄ 组相同,染毒第 8 天起分别以 FJG 20,10,5 g · kg⁻¹ · d⁻¹ (以生药计)ig,并予 NS 0.5 mL/只 ig,1 次/d;DMSA 组:除以 DMSA 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ ig 处理外,余同 FJG 组,作阳性对照。

2.2 肾功能检测 各组 ig 第 4 周末,给予受试物后禁食不禁水 24 h,以大鼠代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,同时眼底静脉丛采集血样,分离血清,依据试剂盒操作说明进行 BUN,SCr,24 h 尿蛋白定量(24 h-UP)测定。

2.3 免疫组织化学染色(SP 法) 各组 ig 第 4 周末,断头处死大鼠,迅速摘取肾脏,取肾脏于 10% 甲醛中固定,常规脱水、石蜡包埋,切片厚 4 μm。肾脏切片经常规脱蜡水洗,3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,微波抗原修复,加小鼠抗大鼠 NF-κB p65 多克隆抗体(一抗,1:75),标本置湿盒内 4 ℃ 过夜,滴加生物素化羊抗兔二抗 IgG(1:100),滴加辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素,DAB 显色,苏木精复染细

胞核,常规脱水,透明,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以博士德公司提供的扁桃腺切片作阳性对照。每鼠 8 张切片。

2.4 计算机图像分析 应用彩色病理图文分析系统,通过光学显微镜放大 400 倍摄取图像,输入图像分析系统内,分别进行肾小球与肾小管中 NF-κB 活化检测:每张切片随机选取 6 个肾小球,计算每个肾小球中染色区域面积占整个肾小球面积的百分比,以均值表示每例肾小球中阳性信号面积;计算每张切片皮质区 60 个高倍视野下阳性小管数与总肾小管数的百分数,以均值表示每例肾小管中的阳性率。

2.5 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对染镍大鼠肾功能变化的影响 与 NS 组比较,NiSO₄ 组 BUN, SCr, 24 h-UP 定量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 NiSO₄ 组比较,FJG 高、中、低组 BUN,SCr,24 h-UP 定量显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),尤以 FJG 高、中组变化明显。FJG 对照组肾功能无异常改变。见表 1。

表 1 FJG 对染镍大鼠 BUN, SCr, 24 h-UP 变化的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	BUN	Scr	24 h-UP
	/g · kg ⁻¹	/mmol · L ⁻¹	/μmol · L ⁻¹	/mg
NS		2.85 ± 0.62	47.84 ± 12.81	13.64 ± 3.67
FJG 对照	10	3.12 ± 0.79	46.25 ± 12.64	14.47 ± 4.15
NiSO ₄	0.002 5	27.64 ± 3.42 ¹⁾	98.84 ± 19.32 ¹⁾	42.22 ± 10.61 ¹⁾
DMSA	0.05	16.36 ± 5.02 ²⁾	79.16 ± 19.34 ²⁾	29.24 ± 7.17 ²⁾
FJG	5	14.86 ± 4.65 ²⁾	81.63 ± 21.72 ²⁾	26.54 ± 6.01 ²⁾
FJG	10	4.72 ± 1.12 ³⁾	49.27 ± 13.09 ³⁾	16.31 ± 4.33 ³⁾
FJG	20	3.37 ± 0.93 ³⁾	46.87 ± 11.36 ³⁾	14.38 ± 3.68 ³⁾

注:与 NS 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 NiSO₄ 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对 NiSO₄ 染毒大鼠肾组织 NF-κB 活化的影响 镜下胞浆或胞核出现棕黄色颗粒,表明存在肾组织 NF-κB 活化。NS 组与 FJG 对照组可见少部分肾小球系膜细胞和远端肾小管上皮细胞有微弱的 NF-κB 活化,偶见肾间质细胞核活化信号;NiSO₄ 组大鼠肾小球系膜细胞、髓质区肾小管上皮细胞和集合管则有较强的活化,活化信号位于细胞胞浆及胞核核周,且有明显的局灶性分布趋势;FJG 高、中、小剂量组与 DMSA 组肾组织中 NF-κB 活化信号则明显低于 NiSO₄ 组($P < 0.05, P < 0.01$),其中,FJG 高、

中剂量组接近 NS 组。见表 2。

表 2 对染毒大鼠肾组织中 NF-κB 活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NF-κB 活化/%	
		肾小球	肾小管
NS		1.47 ± 0.43	8.75 ± 2.44
FJG 对照	10	1.68 ± 0.52	10.36 ± 3.07
NiSO ₄	0.002 5	34.62 ± 9.11 ¹⁾	62.45 ± 14.78 ¹⁾
DMSA	0.05	17.36 ± 5.75 ²⁾	42.18 ± 11.34 ²⁾
FJG	5	15.87 ± 4.98 ²⁾	39.14 ± 10.62 ²⁾
	10	3.15 ± 0.88 ³⁾	15.22 ± 4.57 ³⁾
	20	2.08 ± 0.64 ³⁾	11.48 ± 3.39 ³⁾

4 讨论

NF-κB 是转录因子家族的重要成员,参与多种炎症性细胞因子的合成、细胞增生、细胞凋亡以及成纤维细胞的分化过程^[4],其过度表达与系膜增生性肾小球肾炎及肾间质纤维化密切相关^[5-6]。研究证实,镍暴露对 NF-κB 的活化可产生明显的影响^[7]。经镍化合物诱导转化的啮齿类及哺乳类细胞中,均可发现存在 NF-κB 的过度激活,因此 NF-κB 也是一种与镍诱导的生物学作用密切相关的关键转录因子。毒理学研究证实,水溶性镍盐(如 NiSO₄)暴露,可通过诱发氧化应激、影响细胞膜 ATP 酶活性^[8]等机制导致实验动物肾脏损害,包括肾脏重量增加,尿蛋白含量及 BUN 升高,出现氨基酸尿、肾近曲小管广泛坏死、炎症、纤维化等^[9]。本研究结果显示, NiSO₄(2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)染毒可诱导大鼠肾组织 NF-κB 显著活化,活化的 NF-κB 主要表达于肾小管上皮细胞和间质细胞,仅有少量表达于肾小球固有细胞,并伴随肾功能损害,此与文献报道一致^[10]。提示镍诱导 NF-κB 活化可能成为其产生肾毒性的一种重要机制。中药 FJG 对 NiSO₄ 诱导肾组织 NF-κB 活化具有抑制作用,尤以大、中剂量为著,而本身对正常肾组织 NF-κB 活化无明显影响。同时发现,在抑制 NF-κB 活化的作用方面,高、中剂量 FJG 优于重金属解毒剂 DMSA。提示,FJG 可能通过抑制肾组织 NF-κB 活性的异常升高而减轻镍性肾损害、改善肾功能。

FJG 拮抗镍诱导肾组织 NF-κB 活化的作用可能与以下机制有关:①促排镍。FJG 可明显降低染镍大鼠血清镍水平,促进尿中镍的排泄^[11],从根本上减少了镍诱导肾组织 NF-κB 活化发生的几率。

②抗氧化。研究发现,氧化应激与 NF-κB 活化密切相关。业已证实,FJG 具有肯定的拮抗镍诱发氧化应激的效应^[12]。FJG 干预镍诱导肾组织 NF-κB 活化的分子机制,尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 刚葆琪,庄志雄.我国镍毒理学研究进展[J]. 卫生毒理学杂志,2000,14:129.

[2] Cempel M, Janicka K. Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride[J]. Biol Trace Elem Res, 2002, 90 (1/ 3): 215.

[3] 滕玉莲,吕晓云,朱玉真,等.扶正解毒汤对镍诱导 NRK 细胞微核形成的抑制作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(8):592.

[4] Morrissey J, Klahr S. Transcription factor NF-κB regulation of renal fibrosis during ureteral obstruction [J]. Semin Nephrol,1998, 18(6): 603.

[5] 刘艳红,韩子明.双环醇对 UUO 模型大鼠肾间质核转录因子 κB 和纤溶酶原激活物抑制剂-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):208.

[6] 于俊生,王强,于惠青.升降散对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾组织 NF-κB 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):190.

[7] Cruz M T, Concalo M, Figueiredo A, et al. Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF-κB and AP-1 and increases the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line [J]. Exp Dermatol,2004,13:18.

[8] Sugiyama H, Kashiara N, Makino H, et al. Apoptosis in glomerular sclerosis [J]. Kindney Int, 1996, 49 (1): 103.

[9] 宋媛朝.镍对小鼠睾丸组织三磷酸腺苷酶活性的影响[J]. 中国公共卫生,2005,21(3):331.

[10] Dulcenombre, Gómez-Garre, Raquel Largo, et al. Activation of NF-κB in tubular epithelia cells of rats with intense proteinuria role of angiotensin II and endothelin-1 [J]. Hypertension,2001,4:1171.

[11] 常旭红,赵健雄,卢文艳,等.扶正解毒颗粒对硫酸镍染毒大鼠镍代谢的影响[J]. 毒理学杂志,2008,22(3):200.

[12] 吕晓云,蒲晓丽,朱玉真,等.扶正解毒汤对硫酸镍诱导 16HBE 细胞微核形成的影响[J]. 癌变·畸变·突变,2007,19(4):309.

[责任编辑 聂淑琴]