

三七对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织和尿中细胞间黏附分子-1 表达的影响

黄岩杰^{1*}, 孙志平², 马宁宁³, 梅晓峰¹, 杨晓青¹, 刘霞¹, 张建¹, 任献青¹, 翟文生¹, 丁樱¹

(1. 河南中医学院第一附属医院儿科医院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院, 郑州 450000; 3. 郑州市妇幼保健院, 郑州 450012)

[摘要] 目的: 观察三七对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织和尿中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响,初步探讨其肾脏保护作用的部分分子生物学机制。方法: 采用单侧输尿管梗阻(UUO)诱导大鼠肾小管间质纤维化模型。将 52 只 SD 大鼠随机分为假手术组($n=12$)、模型组($n=20$)、三七 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组($n=20$)。术后第 7,14 天留取标本处死大鼠,处死前 24 h 留取大鼠尿液用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测 ICAM-1 的变化;用免疫组化方法检测肾组织内 ICAM-1 表达和定位。结果: 与假手术组相比,模型组大鼠第 7,14 天肾小管间质损伤评分明显增高($P < 0.05$),肾组织及尿 ICAM-1 表达水平明显升高,且二者之间以及肾组织 ICAM-1 与肾小管间质损伤病理评分(肾损伤指数)呈正相关关系。三七 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组肾脏病理改变及肾组织和尿中 ICAM-1 的表达明显受到抑制($P < 0.05$);与同期模型组比较有明显统计学意义($P < 0.05$)。结论: UUO 模型组大鼠肾组织 ICAM-1 表达与肾损伤指数和尿 ICAM-1 水平分别呈正相关,提示尿中 ICAM-1 可作为检测肾组织 ICAM-1 的表达水平的指标。三七改善了模型组大鼠肾小管间质的病理组织学改变,对肾小管间质纤维化具有一定的保护作用,其机制可能部分地与下调肾组织和尿中 ICAM-1 的水平有关。

[关键词] 三七;肾小管间质纤维化;细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0183-04

Effects of *Panax notoginseng* on Renal and Urinary ICAM-1 Expression in Unilateral Ureteral Obstruction Rats

HUANG Yan-jie^{1*}, SUN Zhi-ping², MA Ning-ning³, MEI Xiao-feng¹, YANG Xiao-qing¹,
LIU Xia¹, ZHANG Jian¹, REN Xian-qing¹, ZHAI Wen-sheng¹, DING Ying¹

(1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 3. Zhengzhou City Maternal and Child Health Care Hospital, Zhengzhou 450012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Panax notoginseng* on renal and urinary intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats. **Method:** Tubulointerstitial fibrosis model was established by unilateral ureteral obstruction (UUO) rat. Fifty-two male SD rats were randomly divided into sham group ($n=12$), UUO model group ($n=20$), *P. notoginseng* $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ group ($n=20$). Half rats in each group were sacrificed respectively on day 7 and day 14. Urine ICAM-1 level was tested by ELISA, renal ICAM-1 expression and localization were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the sham group, tubulointerstitial injury score was significantly higher ($P < 0.05$), and ICAM-1

[收稿日期] 20110426(004)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学基金项目(2006360020)

[通讯作者] *黄岩杰,医学博士,副教授,硕士生导师, Tel:0371-65990568, E-mail: huangyanjie69@hotmail.com

expression in renal tissue and urine was significantly upregulated in model rats on day 7 and day 14. ICAM-1 expression in renal tubulointerstitium was positively correlated with urinary ICAM-1, and was also positively correlated with renal tubulointerstitial injury score (kidney damage index). *P. notoginseng* $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ decreased tubulointerstitial injury score, and suppressed the levels of renal tissue and urinary ICAM-1 expression on day 7 and day 14 significantly, compared with those in the UUO model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The ICAM-1 expression in renal tubulointerstitium was positively correlated with renal tubulointerstitial injury score and urinary ICAM-1 respectively. It suggested that the urinary levels of ICAM-1 could reflect the changes of ICAM-1 in kidney. *P. notoginseng* improved the histological changes in renal tubulointerstitial fibrosis and had certain renoprotective effect in UUO rats. The mechanism might be related to reducing renal ICAM-1 expression and urinary ICAM-1 levels.

[**Key words**] *Panax notoginseng*; tubulointerstitial fibrosis; intercellular adhesion molecule-1

在急、慢性的肾脏疾病中,炎细胞尤其是单核巨噬细胞的肾组织浸润是引发肾小管间质病变的原因之一。目前认为,黏附分子介导的细胞黏附机制在炎细胞浸润、肾小管间质损伤及细胞基质增生过程中起到重要作用。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)是黏附分子中的重要成员,ICAM-1 又名 CD54,属黏附分子中免疫球蛋白超家族成员,ICAM-1 可介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互识别、黏着和传递信号。正常情况下 ICAM-1 很少表达或不表达,当发生免疫反应或受有关因素刺激后表达上调,可增强白细胞与血管内皮细胞的黏附,促使单核/巨噬细胞向炎症组织浸润和活化 T 淋巴细胞,促进炎症的发生和发展^[1]。我们以前的研究^[2]及其他相关的文献报道^[3]提示,活血化瘀药具有不同程度的抗黏附分子表达和肾小管间质纤维化的作用。在该项研究中通过建立肾小管间质纤维化实验动物模型,观察活血化瘀药三七对肾组织和尿中 ICAM-1 的影响,深入研究其对肾小管间质损伤的治疗效果和作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 三七颗粒(江阴天江药业有限公司,批号 0905234)每袋 3 g。ICAM-1 兔多克隆一抗,武汉博士德生物工程公司,编号 BA2189。大鼠尿 ICAM-1 ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems,批号 10-10)。

1.2 动物 健康雄性 SD 大鼠(购自河南省动物实验中心),普通级,8 周龄,体重(200 ± 20)g。光照周期 12 h:12 h,在恒温(26 ± 2)℃,相对湿度 65%~75%,自由进食标准颗粒型动物饲料、饮自来水条件下正常喂养。

1.3 仪器 KHB ST-360 型全自动酶标仪(上海科华),T230G 型分光光度计(上海精密),Leica DFC420C 型图像采集系统(德国产),Leica Qwin plusDFC420C 型图像采集软件(德国产),Biosens Digital Imaging System V1.6 图片分析系统(上海山富科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药 大鼠 52 只适应喂养 1 周后,将其随机分为:①假手术组 7 d($n=6$),14 d($n=6$),生理盐水 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig;②UUO 组 7 d($n=10$),14 d($n=10$),生理盐水 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig;③三七组 7 d($n=10$),14 d($n=10$),三七颗粒 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig,模型组与三七组大鼠参照文献[4]行单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral occlusion,UUO)术,假手术组只分离左侧输尿管不结扎,造模当天开始 ig。分别于术后 7,14 d 处死各组一半数量的大鼠。

2.2 标本采集及时间

2.2.1 尿标本的处理与检测 大鼠处死前 1 d 用代谢笼留取 24 h 尿标本,留取尿标本时加入适量防腐剂(二甲苯分析纯),尿液以 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后留取 5 mL,分装后保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待测,尿 ICAM-1 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测。

2.2.2 肾脏 用生理盐水盥洗双肾后留取左侧肾脏,去除肾包膜后由肾门纵向剖开,一半用甲醛(10%中性福尔马林)固定。另一半置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 组织学处理 常规行 HE 和 Masson 染色,光镜观察皮质肾小管-间质的病理变化及炎性细胞浸润情况。400 倍光镜下,每张切片随机选择 10 个不

含肾小球的视野,观察肾小管间质的病理变化。肾小管间质病变由3个参数判定(小管管型,小管扩张,肾小管上皮细胞水肿、变性、坏死;间质炎细胞的浸润;间质纤维化的程度)每个参数按0~3分评定(0:正常;1:轻度受损,病变范围<15%;2:中度受损,病变范围≥15%,<50%;3:重度受损,病变范围≥50%);3个参数得分相加为每个样本小管间质的评分,介于0~9分^[4]。

2.4 免疫组织化学染色 染色过程参见说明书。结果评估:每张切片随机选取10个互不重叠的高倍视野(×400),应用高清晰彩色病理图像分析系统进行免疫组化图像分析,测定阳性细胞吸光度(A),取平均值。

2.5 统计学处理 所有数据采用SPSS 13.0统计软件进行处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析。相关分析采用Pearson相关系数检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肾组织病理学改变

3.1.1 HE染色 假手术组大鼠肾脏未见明显病变,模型组术后第7天,皮质区变薄,部分近端小管上皮细胞肿胀空泡变性,管腔内可见脱落坏死的上皮细胞,肾小管轻度扩张,管腔内偶见蛋白管型,肾间质增宽,可见中重度间质水肿和明显的炎性细胞浸润,以及轻度纤维物质增生;术后第14天,上述病变进一步加重。三七 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 治疗后,各时间点评分指数均有下降。

3.1.2 Masson染色 假手术组可见染成绿色的胶原纤维主要位于肾小管基底膜,而小管间质染色较少。模型组梗阻肾间质可见染成绿色的胶原纤维,且梗阻时间越长,阳性染色面积随之扩大;三七 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组各时间点肾间质胶原相对面积均有所减少。

3.1.3 各组病理损伤评分统计 对HE,Masson染色进行肾小管间质损伤综合评分,结果发现随梗阻时间的延长,评分指数逐渐增加,经三七治疗后,各时间点评分指数均有所下降,有统计学意义($P < 0.05$),以第7天为著。第14天仍有持续的改善,但不能完全逆转病变的进展(表1)。

3.1.4 肾组织ICAM-1免疫组化染色 假手术组肾组织内ICAM-1仅在肾小球系膜区有基础的表达,肾小管间质基本无表达。ICAM-1于术后第7,14

表1 各组大鼠肾小管间质损伤病理评分($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	病理损伤评分	
		第7天	第14天
假手术	-	$0.83 \pm 0.13^{2)}$	$0.84 \pm 0.18^{2)}$
模型	-	4.10 ± 0.22	5.56 ± 0.56
三七	0.84	$2.65 \pm 0.19^{1)}$	$4.51 \pm 0.54^{1)}$

注:与同期模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

天在肾间质表达明显上调,肾小管上皮细胞也有少量表达,肾小球系膜区的表达亦较假手术组增加。三七 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 治疗后第7,14天均明显降低了ICAM-1在肾小管间质的表达,与模型组比较均有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

3.1.5 尿中ICAM-1检测 假手术组大鼠尿中ICAM-1在第7天和第14天表达水平较低,2个时间段无明显差异。与假手术组相比,模型组第7天和第14天尿中ICAM-1的表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比三七 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在第7天和第14天降低了尿中ICAM-1的表达水平($P < 0.05$)(表2)。

表2 各组大鼠肾组织和尿中ICAM-1表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ICAM-1/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	
		肾组织	尿
假手术(第7天)	-	$60.08 \pm 6.54^{2)}$	$10.54 \pm 1.63^{2)}$
假手术(第14天)	-	$59.89 \pm 6.56^{2)}$	$10.89 \pm 1.46^{2)}$
模型(第7天)	-	145.82 ± 6.37	103.68 ± 6.93
模型(第14天)	-	138.03 ± 5.71	98.86 ± 4.92
三七(第7天)	0.84	$131.13 \pm 6.20^{1)}$	$83.71 \pm 6.76^{1)}$
三七(第14天)	0.84	$123.09 \pm 1.97^{1)}$	$55.21 \pm 2.81^{1)}$

3.2 相关性分析

3.2.1 模型组大鼠肾间质损伤指数、肾组织及尿ICAM-1表达水平的相关性分析 第7,14天模型组大鼠肾组织ICAM-1与肾间质损伤指数的表达水平呈显著正相关关系,相关指数分别为 $r = 0.627$ ($P = 0.034$)和 $r = 0.689$ ($P = 0.027$);第7,14天肾组织ICAM-1与尿ICAM-1表达水平呈显著正相关关系,相关指数分别为 $r = 0.631$ ($P = 0.047$)和 $r = 0.784$ ($P = 0.016$)。

3.2.2 三七组大鼠肾间质损伤指数与肾组织及尿ICAM-1表达水平的相关性分析 第7,14天三七组大鼠肾组织ICAM-1与肾间质损伤指数的表达水平呈显著正相关关系,相关指数分别为 $r = 0.916$ ($P = 0.001$)和 $r = 0.890$ ($P = 0.002$);第7,14天肾组织

ICAM-1 与尿 ICAM-1 表达水平呈显著正相关关系, 相关指数分别为 $r = 0.778 (P = 0.011)$ 和 $r = 0.831 (P = 0.005)$ 。

4 讨论

现代医学研究表明, 肾小管间质纤维化的病理发生过程包括炎细胞浸润, 细胞外基质沉积以及肾功能的进行性下降。黏附分子介导的细胞黏附机制是炎细胞浸润及小管间质损伤的分子基础^[5]。ICAM-1 是诱导炎性细胞向肾间质组织浸润的主要黏附分子, 在肾小管间质纤维化早期起到了重要作用^[6]。本研究观察到 UUO 术后, 与假手术组相比模型组肾间质损伤指数和肾组织 ICAM-1 表达明显上调, 且肾组织 ICAM-1 的表达与肾间质损伤指数呈明显正相关关系; 随着梗阻时间的延长, 至第 14 天 ICAM-1 表达稍有下降, 但仍处于较高水平。三七治疗组肾间质损伤指数和肾组织内 ICAM-1 的表达与模型组相比在 2 个时间段均明显受到了抑制, 提示三七能减轻肾间质炎症反应, 有效减轻肾小管间质纤维化程度, 其保护肾小管间质损伤的作用机制可能是通过抑制 ICAM-1 的过度表达而实现的。

郭志勇等^[7]检测了不同肾脏病患者尿 ICAM-1 的变化, 结合肾穿刺病理结果分析, 发现患者尿 ICAM-1 水平显著高于正常对照组, 其中微小病变肾病尿 ICAM-1 水平最高, 其次是狼疮性肾炎, 且与尿蛋白/肌酐呈正相关, 提示尿 ICAM-1 与肾脏病变活动相关; 14 例患者激素治疗后, 尿 ICAM-1 水平与治疗前相比, 有不同程度的下降, 微小病变肾病尿 ICAM-1 下降最明显, 提示尿 ICAM-1 含量变化可能作为判断病情的治疗疗效的参考指标之一。本实验也观察到 UUO 术后第 7, 14 天模型组大鼠肾组织和尿 ICAM-1 表达水平较假手术组明显上调 ($P < 0.01$), 且模型组大鼠肾组织 ICAM-1 的表达与肾间质损伤指数及尿 ICAM-1 的表达均呈正相关关系。与模型组相比, 三七组在两个时间点上降低了肾组织和尿 ICAM-1 水平 ($P < 0.05$)。另外, 在预实验中我们也发现, UUO 模型组大鼠血中 ICAM-1 水平较假手术组明显增高, 且三七在第 7, 14 天降低了 ICAM-1 的水平。根据文献^[8]报道, 血中 sICAM-1 (soluble form of ICAM-1) 被单核细胞和内皮细胞释放, 可结合它自己或其他蛋白质, 做为一个相对分子质量为 $240 \sim 500 \times 10^3$ 的分子复合物存在于循环中。这个大分子的复合物在理论上不能通过肾小球

滤过膜进入尿中, 而尿中 ICAM-1 是相对分子质量大约为 $50 \sim 100 \times 10^3$ 的单体^[9], 这些结果提示, 尿中的 ICAM-1 主要来自肾脏。我们的结果也提示在病理状态下, 尿中 ICAM-1 的水平与肾内 ICAM-1 的表达呈正相关, 可反映肾内 ICAM-1 的变化。

总之, 该研究结果表明, 在 UUO 肾小管间质纤维化的模型中尿和肾脏组织黏附分子 ICAM-1 的表达上升明显, 提示 ICAM-1 参与了肾小管间质纤维化发展的病理过程。三七减轻了肾小管间质的组织学损伤, 这种作用机制可能与下调肾组织 ICAM-1 的表达和尿 ICAM-1 的水平有关。同时相关性分析表明尿中 ICAM-1 的水平可反映肾内 ICAM-1 的变化, 指导临床早期评价肾内可能存在由黏附分子诱导的免疫性炎症和协助判断治疗效果。

[参考文献]

- [1] Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 60: 305.
- [2] 黄岩杰, 马宁宁, 杨晓青, 等. 当归对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中黏附分子 ICAM-1 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 1(1): 167.
- [3] 李丹丹, 焦炳华, 孟建中, 等. 低分子肝素对大鼠肾缺血再灌注损伤时 ICAM-1 及 MCP-1 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2008, 48(8): 12.
- [4] 薛痕, 樊均明, 陈亮, 等. 大鼠肾小管-间质纤维化动物模型 [J]. *四川动物*, 2004, 23(1): 16.
- [5] 陈柏. 肾小管间质疾病诊疗新技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002: 55.
- [6] 孙桂芝, 周同, 吴开胤, 等. 树突状细胞在大鼠输尿管梗阻后肾组织中的分布与作用 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(3): 174.
- [7] 郭志勇, 崔若兰, 张晓英. 不同病理类型肾病患者尿中可溶性细胞间黏附分子-1 的变化 [J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(4): 350.
- [8] Seth R, Raymond F D, Makgoba M W. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorder [J]. *Lancet*, 1991, 1: 83.
- [9] Teppo A M, von Willebrand E, Honkanen E, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) after kidney transplantation; the origin and role of urinary sICAM-1 [J]. *Transplantation*, 2001, 71(8): 1113.

[责任编辑 聂淑琴]