

橙皮苷对 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 TLR-4 和 NF- κ B 表达的影响研究

陈明喆 何伟

【摘要】 目的 研究橙皮苷对 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 TLR-4 和 NF- κ B 表达的影响,探讨橙皮苷对肾脏是否有保护作用及其作用机理。**方法** 雄性 SD 大鼠 60 只随机分为正常组、模型组和橙皮苷治疗组,IgA 模型建立成功后,橙皮苷治疗组给予橙皮苷 10 mg/(kg·d)灌胃治疗,正常组和模型组给予等量生理盐水灌胃,治疗 4 周后、8 周后分别处死大鼠,检测其 24 小时尿蛋白、血尿素氮、血白蛋白、白介素-1(interleukin-1,IL-1)和白介素-6(IL-6),免疫组化、RT-PCR 以及 Western blot 检测肾组织中 TLR-4 和 NF- κ B 表达。**结果** 在整个实验过程中,正常组饮食正常,精神良好,模型组和橙皮苷治疗组在造模成功后表现有一定的食欲不振和精神萎靡,使用橙皮苷治疗后,上述情况有所缓解;与正常组相比,模型组 24 小时尿蛋白、血尿素氮、IL-1 和 IL-6 明显升高($P<0.05$),白蛋白明显下降($P<0.05$),治疗 4 周后,上述指标有明显改善,治疗 8 周后其基本和治疗 4 周后一致;RT-PCR、Western blot 和免疫组化可见,相较于正常组,模型组 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达明显增加($P<0.05$),橙皮苷治疗 4 周后,其有明显降低,治疗 8 周后,表达更弱($P<0.05$)。**结论** 橙皮苷可明显下调 TLR-4 和 NF- κ B 的表达,进而降低炎症反应,改善肾功能,最终保护肾脏组织。

【关键词】 橙皮苷; IgA 肾病; Toll 样受体 4; 自然细胞杀伤因子- κ B

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.01.002

Effect of hesperidin on TLR-4 and NF- κ B in kidney tissue of IgA nephropathy rats CHEN Mingzhe, HE Wei. The Nephrology Department of Huangshi Central Hospital, Huangshi 435000, China
Corresponding author: HE Wei, E-mail: hsyiyuantougao@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of hesperidin on TLR-4 and NF- κ B in IgA nephropathy rats, and discuss whether hesperidin have the protective effect to kidney and its protection mechanism.
Methods 60 male SD rats were randomly divided into normal group, model group and hesperidin treatment group, after the IgA model was successfully established, hesperidin treatment group was given hesperidin (10 mg/kg·d) to lavage treatment, the normal group and model group was given equal saline lavage, and after 4 weeks and 8 weeks of treatment, rats were sacrificed to detect the 24h urine protein, serum BUN, blood albumin, interleukin 1 and interleukin-6, immunohistochemistry, RT-PCR and Western Blot was used to detect the expression of TLR-4 and NF- κ B in renal tissue. **Results** In the process of the whole experiment, the normal group was fed with normal diet and the spirit was good, model group and the hesperidin group has certain anorexia and depression after molding, the above situation was improved after using hesperidin; Compared with normal group, model group in 24h urinary protein, serum BUN, interleukin-6 and interleukin-1 rise obviously, albumin was significantly lower, after 4 weeks of treatment, those indices were improved significantly, results of 8 weeks and 4 weeks of treatment were basically the same; Compared with normal group, TLR-4 and NF- κ B protein and mRNA expression in model group were

基金项目: 435000 黄石中心医院自筹项目(2014HS023)

作者单位: 鄂东医疗集团黄石市中心医院肾内科(陈明喆),老年病科(何伟);湖北理工学院医学院(何伟)

作者简介: 陈明喆(1981-), 硕士,主治医师。研究方向:中西医结合治疗老年病。E-mail:12616918@qq.com

通信作者: 何伟(1980-), 硕士,主治医师,讲师。研究方向:中西医结合治疗肾病。E-mail: hsyiyuantougao@

significant increased, after 4 weeks of treatment of hesperidin, these indices were significantly reduced, after 8 weeks of treatment, the expression was more less ($P < 0.05$). **Conclusion** Hesperidin can obviously decrease the expression of TLR-4 and NF- κ B and inflammatory reaction, it also can improve renal function, eventually to protect kidney.

【Key words】 Hesperidin; IgA nephropathy; Toll-like receptor 4; NF- κ B

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是临床中最常见的一种肾小球原发性疾病,本病多见于青少年儿童,其临床主要表现为反复发作的血尿以及不同程度的蛋白尿^[1]。由于本病多和自身免疫力相关,所以在发病前长伴有一定的上呼吸道病史,此外本病预后良好,但是在临床中仍有 25% 到 30% 的患者预后不理想,进而发展为终末期肾病^[2]。对于本病的治疗西药多以激素治疗为主,而中草药在治疗此病时具有很好疗效,但是中草药在向国际推广时,面临着药物成分复杂,药理作用不明确的尴尬境地,所以采用现代化思维来研究中药是具有实践意义的^[3]。橙皮苷是从橙皮中提取的一类苷类化合物,本次研究用橙皮苷治疗 IgA 肾病大鼠,观察治疗后其肾脏组织中 TLR-4 和 NF- κ B 的表达特点,以明确橙皮苷是否可以缓解 IgA 肾病大鼠症状以及其治疗机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本次实验共购买 SD 大鼠 60 只,所有大鼠均购于华中科技大学同济医学院动物实验中心,大鼠体质量为 180 ~ 200 g,所有大鼠购买后均给予定时定量饮水,同时勤换垫料的基础上适应性喂养 2 周,2 周后开始构建 IgA 肾病模型。

1.1.2 主要试剂和材料 本次药物橙皮苷购于湖北合天化工有限公司;造模用试剂牛血清蛋白(BSA)、脂多糖(LPS)以及四氯化碳(CCl_4)购于中国国药公司;造模用花生油购于山东鲁花有限公司;造模用蓖麻油购于上海化学有限公司;TLR-4 抗体, NF- κ B 抗体购于英国 abcam 公司,总 RNA 提取试剂盒购于天根生物公司,引物合成由南京金斯瑞生物工程公司完成。

1.2 动物模型的建立以及分组

所有大鼠在造模前均给予一次检测血液肾功能,肾功能没有异常后开始分组和造模,60 只大鼠采用随机原则分为正常对照组、模型对照组(IgA 肾病组),以及橙皮苷治疗组,每组为 20 只,模型对照组和橙皮苷治疗组在分组后即给予造模,造模按照经典方法进行^[4],首先每天给予 1 次牛血清蛋白灌

胃,灌胃量为 400 mg/(kg · d),共灌胃 10 周;大鼠每周注射一次 0.5 mL 蓖麻油和 0.1 mL 四氯化碳,共 9 周;分别于第 6 周后、第 8 周后给予大鼠脂多糖 0.05 mg 尾静脉注射;为使实验准确,在造模时正常对照组每天给予等量的生理盐水灌胃,注射也为等量生理盐水,10 周后,观察其造模成功,造模成功的判断标准为:可见明显血尿以及镜下检测可发现有 30% 的红细胞。

1.3 大鼠治疗方法

大鼠在造模成功后开始治疗,橙皮苷治疗组给予橙皮苷 10 mg/(kg · d)灌胃治疗(10 mg 橙皮苷溶于 1 mL 的生理盐水中),正常对照组和模型对照组给予等量生理盐水灌胃,分别于治疗 4 周后、8 周后处死大鼠,进行下述实验。

1.4 组织提取方法

大鼠处死时采用 3% 的戊巴比妥麻醉,麻醉后沿腹中线切开大鼠腹部,首先从心尖处取血,取血后立即离心,离心速度为 4000 rpm,离心后提取上清液置于超低温冰箱保存备用检测(-86°C),之后迅速取出肾脏,统一取左侧肾脏切取十分之一置于 10% 的中性福尔马林溶液中保存,其余置于超低温冰箱保存备用(-86°C)。

1.5 生化指标检测

大鼠生化指标的检测采用全自动生化仪完成,检测指标为 24 小时尿蛋白定量、血尿素氮以及白蛋白,炎症因子白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)和 IL-6 的检测采用 Elisa 试剂盒,试剂盒购于武汉 bioswep 公司,检测方法为双抗体夹心法。

1.6 免疫组化

本次检测用免疫组化法检测大鼠肾脏组织中 TLR-4 和 NF- κ B 的表达具体方法如下:(1)首先将多聚甲醛固定好的肾脏组织取出,酒精梯度脱水后将其置于融化的石蜡组织中进行包埋,包埋后进行切片,切片厚度为 3 ~ 5 μm ,之后将切片置于 60 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中烘烤 20 分钟;(2)烘烤后将组织进行脱蜡,之后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟;(3)上述完成后采用 3% 的双氧水浸泡,浸泡后洗涤,洗涤完成后修复抗原,之后加入相应一抗、二抗后,DAB 显

色,显色后脱水、透明、封片,显微镜下观察染色程度以及蛋白的表达位置。

1.7 肾组织 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 的检测

肾组织 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 的检测采用半定量 RT-PCR 法,具体为称取 30 mg 肾脏组织,用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,提取后定量调平,之后行逆转录以及扩增反应,引物设计为 TLR-4,上游: 5'-GGCGAGCGTCATGTACACACAAC-3',下游: 5'TGGAAAGCCGACGCAGACGCTGC-3',产物长度为 296 bp; NF- κ B 上游: 5' CTCGAAATACTCACAAG-GTCCCGGCGAT-3',下游: 5' AC GGTACAACGAG-TAAAGAAGAC-3',产物长度为 296 bp; 内参为 β -actin, 其中上游为: 5' CAGGCGTAAGCTCCGC-CACTTCCGTAT-3',下游为: 5' GGCCGGCACAAGCTTCTTCGGTAC,产物长度为 521 bp。反应条件为 94℃ 预变性 2 分钟,之后同样温度变性 30 秒,48.6℃ 退火 30 秒,72℃ 延伸 2 分钟,共 35 个循环;最后再延伸 5 分钟。完成后每组各取 2 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳,电泳完成后采用凝胶成像仪照片,并分析电泳带灰度值,全组以 β -actin 为内参,每组实验重复 3 次。

1.8 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达的检测

肾组织 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白质的表达检测采用 Western blot 法,首先用总蛋白提取试剂盒提取肾脏组织中总蛋白,之后总蛋白用 BCA 法定量,定量后立即给予调平,再测定一次后进行下述实验,首先设置好实验分组,之后每组各取 50 μ g 进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完成后切取目标蛋白,之后将其立即转移到 PVDF 膜上(美国 Santa 公司),转移后用脱脂牛奶封闭 2 小时洗涤 3 次后加入一抗,洗涤 3 次,之后加入二抗洗涤 3 次,洗涤完成后进行 ECL 荧光照片,全组实验以 β -actin 作为内参,凝胶成像仪分析系统扫描并定量胶片条带灰度值,每组实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

本次研究数据统计采用 SPSS 18.0 统计软件进行,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析,各组间比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 判定为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

在分组前所有大鼠饮食均正常,同时皮毛光滑

有明显的光泽,而造模成功后,模型组和橙皮苷治疗组大鼠活动明显减少,同时精神萎靡,毛色发黄,橙皮苷开始治疗后,皮毛等明显有好转,饮食和饮水也有明显改善,精神活动虽有一定改善,但不明显。

2.2 肾功能相关指标

由表 1 可见,模型组与对照组相比,血尿素氮和 24 小时尿蛋白明显升高($P<0.05$);白蛋白明显降低,橙皮苷治疗 4 周,血尿素氮和 24 小时尿蛋白均明显降低($P<0.05$),白蛋白明显升高,治疗 8 周后,上述指标进一步改善($P<0.05$)。

表 1 治疗 4 周后和 8 周后大鼠肾功能基本指标评价

组别	血尿素氮 (mmol/L)	白蛋白 (g/L)	24 小时尿蛋白 (g/24 小时)
正常组			
治疗 4 周后	4.09 \pm 1.28	36.11 \pm 6.74	0.22 \pm 0.04
治疗 8 周后	4.66 \pm 1.26	35.21 \pm 7.73	0.25 \pm 0.06
模型组			
治疗 4 周后	9.86 \pm 2.92 ^a	21.83 \pm 7.16 ^a	1.75 \pm 0.52 ^a
治疗 8 周后	9.81 \pm 3.41 ^a	20.59 \pm 8.06 ^a	1.83 \pm 0.41 ^a
治疗组			
治疗 4 周后	8.71 \pm 2.11 ^{ab}	24.46 \pm 7.82 ^{ab}	1.41 \pm 0.35 ^{ab}
治疗 8 周后	7.88 \pm 2.41 ^{ab}	27.36 \pm 6.56 ^{ab}	1.36 \pm 0.33 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

2.3 血清 IL-1 和 IL-6 的测定

与正常组比较,模型组大鼠 IL-1 和 IL-6 明显升高($P<0.05$)。橙皮苷治疗 4 周后,其水平较模型组均明显下降($P<0.05$),治疗 8 周后进一步降低。详见表 2。

表 2 治疗 4 周后和 8 周后大鼠血清中 IL-1 以及 IL-6 含量变化

组别	IL-1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常组		
治疗 4 周后	121.24 \pm 21.44	30.27 \pm 10.23
治疗 8 周后	118.23 \pm 25.31	32.57 \pm 9.92
模型组		
治疗 4 周后	240.21 \pm 50.56 ^a	97.54 \pm 40.16 ^a
治疗 8 周后	250.53 \pm 62.59 ^a	91.26 \pm 34.71 ^a
治疗组		
治疗 4 周后	188.33 \pm 49.21 ^{ab}	72.13 \pm 20.92 ^{ab}
治疗 8 周后	173.85 \pm 43.26 ^{ab}	69.12 \pm 19.28 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

2.4 免疫组化

免疫组化可见,正常对照组只有少量的 NF-κB 和 TLR-4 分泌(图中褐色部分所见),模型组 NF-κB 和 TLR-4 明显增高,橙皮苷治疗后上述两个指标分泌均明显下降,治疗 8 周后下降更明显,详见图 1 和图 2。

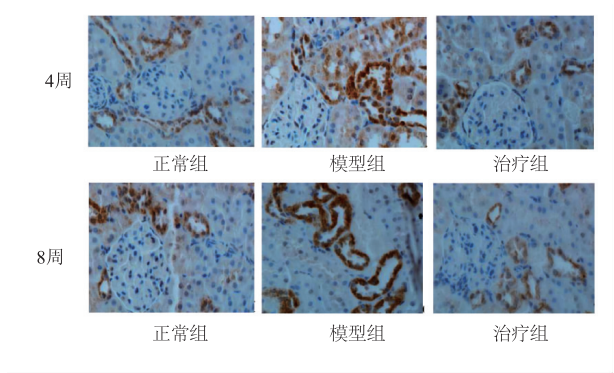


图 1 大鼠肾脏组织中 NF-κB 免疫组化图

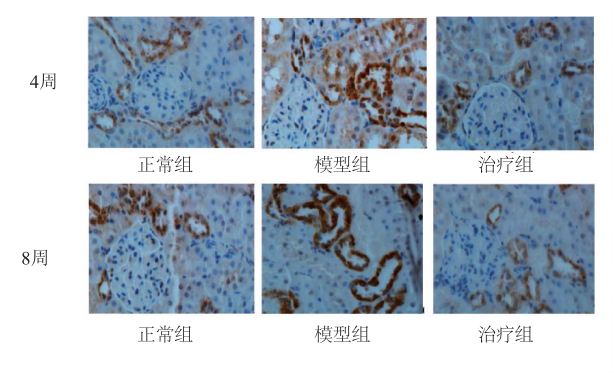


图 2 大鼠肾脏组织中 TLR-4 免疫组化图

2.5 蛋白表达

与正常组相比,模型对照组 NF-κB 和 TLR-4 蛋白表达均明显升高 ($P<0.05$),治疗 4 周后 NF-κB 和 TLR-4 明显降低 ($P<0.05$),治疗 8 周后基本和治疗 4 周后一致,详见图 3 和表 3。

2.6 mRNA 表达

与正常组相比,模型对照组 NF-κB 和 TLR-4 的 mRNA 表达均明显升高 ($P<0.05$),治疗 4 周后 NF-κB 和 TLR-4 明显降低 ($P<0.05$),治疗 8 周后基本和治疗 4 周后一致,详见图 4 和表 4。

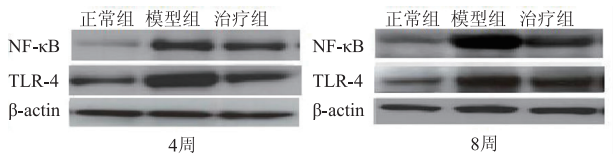


图 3 治疗 4 周后和 8 周后大鼠肾脏组织中 NF-κB 和 TLR-4 的蛋白表达

表 3 治疗 4 周后和 8 周后大鼠肾脏组织中 NF-κB 和 TLR-4 的蛋白的相对表达量

组别	NF-κB	TLR-4
正常组		
治疗 4 周后	0.22±0.04	0.76±0.16
治疗 8 周后	0.63±0.06	0.56±0.13
模型组		
治疗 4 周后	1.72±0.32 ^a	2.88±0.72 ^a
治疗 8 周后	2.98±0.54 ^a	2.32±0.49 ^a
治疗组		
治疗 4 周后	0.99±0.15 ^{ab}	1.04±0.35 ^{ab}
治疗 8 周后	1.24±0.26 ^{ab}	1.12±0.34 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

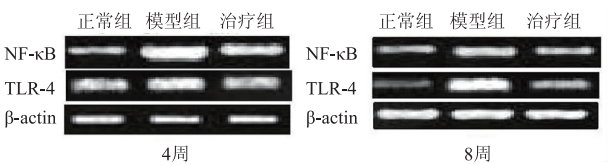


图 4 治疗 4 周后和 8 周后大鼠肾脏组织中 NF-κB 和 TLR-4 的 mRNA 表达

表 4 治疗 4 周后和 8 周后大鼠肾脏组织中 NF-κB 和 TLR-4 的 mRNA 的相对表达量

组别	NF-κB	TLR-4
正常组		
治疗 4 周后	0.53±0.12	0.71±0.20
治疗 8 周后	0.65±0.18	0.22±0.09
模型组		
治疗 4 周后	3.12±0.79 ^a	1.99±0.31 ^a
治疗 8 周后	1.21±0.29 ^a	2.91±0.32 ^a
治疗组		
治疗 4 周后	1.42±0.28 ^{ab}	1.09±0.28 ^{ab}
治疗 8 周后	0.72±0.14 ^{ab}	0.56±0.18 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

IgA 肾病简而言之就是一种以血清中 IgA 明显升高,造成其在肾脏中过度聚集,进而引发病变的一种病症^[5]。目前已有大量的研究显示^[6-8],IgA 肾病与遗传和基因表达异常密切相关,是典型的免疫系统疾病。单纯的降低免疫反应危害较大,非急性患者使用会带来很多不良反应,而目前西药治疗本病没有特效药,因此积极研究和开发治疗本病的药物是十分必要的。已有的研究表明,IgA 免疫球蛋白的异常增高可以造成其在肾脏的沉积,而沉积最主要的危害就是引起肾脏炎症反应,这种炎症反应

必须积极消除,否则会反作用于已经受损的肾脏,造成其后续并发终末期肾炎、肾脏衰竭等^[9]。因此治疗本病的原则除降低免疫反应外,依靠药物降低免疫炎症介质,使其不易在肾脏中沉积是治疗本病的一个方向。

橙皮是经典中药材之一,其价格便宜但效果较好,临床中多用其配合其他中药材合用,具有化痰理气、健脾导滞等疾病,此外其还可以用于治疗感冒咳嗽,食欲不振,胸腹胀痛以及肠鸣便泻等^[10-11],橙皮苷是从橙皮中提取的一类化合物,研究显示橙皮苷具有维持患者渗透压、增强患者毛细血管的韧性、降低胆固醇等方面作用,而近年来关于其可以调节肾功能,改善一些肾病也有文献报道^[12],但是目前关于其是否可以治疗 IgA 肾病还没有文献报道,本次采用经典造模法构建 IgA 肾病模型,该造模方法虽然造模时间长,但其主要作用为破坏大鼠免疫能力,因此将其用于 IgA 肾病发生后的研究是有意义的,研究显示,与正常组相比,模型组 24 小时尿蛋白、血肌酐、白介素 1 和白介素 6 明显升高($P<0.05$),白蛋白明显下降($P<0.05$),治疗 4 周后 24 小时尿蛋白、血肌酐、白介素 1 和白介素 6 明显降低,白蛋白明显升高,而治疗 8 周后,上述指标基本与治疗 4 周后一致,这提示橙皮苷对 IgA 肾病大鼠短期内具有一定的调节作用,但是远期效应一般。

白介素 1 和白介素 6 的降低表明其对炎症反应具有很好的调节作用,但具体是哪种酶的调节还需明确,由于炎症反应首先发生于 IgA 免疫蛋白集结于肾病后,因此降低炎症反应说明其可以缓解 IgA 肾病的进展,临床中 TLRs 是既参与免疫反应又参与炎症反应的重要因子,本因子可在肝脏、肾脏、脾以及肺中广泛表达,进而介导炎症反应,其靶向介导炎症因子较多,其中激活转录因子 NF- κ B 是最为直接的一环,NF- κ B 是炎症反应最典型介质之一,其可以杀伤坏死的细胞,但是在杀伤的同时也会激活大量炎症因子,诸如 IL-1 和 IL-6,最终影响免疫和炎症反应^[13-16]。本次研究采用免疫组化、Western blot 以及 RT-PCR 重点观察其治疗后 NF- κ B 和 TLR-4 表达明显降低,这提示橙皮苷对 IgA 肾病具有很好的调节作用。

综合提示:橙皮苷可明显下调 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 TLR-4 和 NF- κ B 的表达,进而降低炎症

反应,改善肾功能,最终保护肾脏,但其调控炎症反应远期效应较差,具体原因仍有待于后期研究进行。

参 考 文 献

- [1] 周胜元,杨洪涛. IgA 肾病中医分型的研究进展[J]. 西部中医药,2007,20(8):85-87.
- [2] Sena LD, Deressa WA, Ali AA. Analysis of trend of malaria prevalence in south-west Ethiopia; a retrospective comparative study[J]. Malaria Journal,2014,13(1):343-343.
- [3] Soltani S, Hafshejani A M, Salehiniya H. Trend of disability prevalence in Iran;An evidence to improve disability data. [J]. Journal of Research in Medical Sciences,2015,20(5):531-532.
- [4] 彭伟,刘郑荣. 两种 IgA 肾病大鼠模型的比较[J]. 南方医科大学学报,2008,28(10):1842-1845.
- [5] 汪力,王少清. IgA 肾病的发病机制及治疗进展[J]. 医学综述,2015(15):2712-2714.
- [6] 邹粤,于雪莲. IgA 肾病现代研究进展[J]. 光明中医,2015,(3):663-665.
- [7] 周朝敏. IgA 肾病发病机制研究进展[J]. 器官移植内科学杂志,2015,(2):56-62.
- [8] 吕继成. IgA 肾病治疗进展及思考[J]. 临床内科杂志,2014,31(5):297-299.
- [9] Fliser D, Bahlmann FH. Anemia and Progression of Chronic Kidney Disease [M]// Studies on Renal Disorders. Humana Press,2011:611-630.
- [10] 黄燕玲,罗宗铭. 橙皮提取物的抗氧化作用研究[J]. 广东化工,2001,28(4):32-33.
- [11] 方岩雄,张焜. 橙皮的综合利用[J]. 广东工业大学学报,1994,(S1):86-91.
- [12] 殷章红,罗鹏程,王才英. 橙皮苷抑制 JNK 信号通路辅助治疗 2 型糖尿病大鼠[J]. 长春中医药大学学报,2015,31(3):460-462.
- [13] 徐佳,崔蕊. IgA-I 号治疗 IgA 肾病肾组织 IL-1 β ,IL-6 检测分析[J]. 黑龙江医学,2008,32(9):663-665.
- [14] 刘小平,胡顺金,方琦. 大鼠 IgA 肾病模型的建立及血清中 IL-6、FN、NO 的检测[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(1):5-8.
- [15] 王菁,程晓东,张小宁,等. IgA 肾病患者血清 IgA 及治疗前后尿液 IL-6 水平改变的临床价值[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(6):55-57.
- [16] Schneeman T A, Bruno M E, Schjerven H, et al. Regulation of the polymeric Ig receptor by signaling through TLRs 3 and 4; linking innate and adaptive immune responses. [J]. Journal of Immunology,2005,175(1):376-384.

(收稿日期:2016-07-09)

(本文编辑:董历华)