

· 论著 ·

儿茶素对肾病综合征 TGF- β 1 表达的影响研究

何小解¹, 卢向阳², 易著文¹, 党西强¹, 何庆南¹, 吴小川¹

(1. 中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室, 湖南 * 长沙 410011; 2. 湖南农业大学, 湖南 * 长沙 410011)

[摘要] 目的 研究儿茶素对肾病综合征大鼠 TGF- β 1 表达的影响。方法 20 只 SD 雌性大鼠随机分成正常组、肾病组、激素组、儿茶素治疗组共 4 组。实验末应用生化法测定血清中白蛋白 (Alb)、总蛋白 (TP)、三酰甘油 (TG)、BUN、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 及 24 h 尿蛋白排泄量, 分别应用免疫组化与原位杂交法检测肾固有细胞中 TGF- β 1 与 TGF- β 1-mRNA 的表达, 并应用半定量评分法对各组大鼠病理改变进行计量分析。结果 儿茶素治疗组大鼠血清中总 TGF- β 1 [(59.40 ± 8.12) μ g/L]、活性 TGF- β 1 [(47.56 ± 9.88) μ g/L], 肾组织中 TGF- β 1 [(45.1 ± 2.0) %]、TGF- β 1-mRNA 表达水平 [(51.6 ± 3.19) %] 均明显低于肾病组 [分别为 (127.78 ± 16.11) μ g/L, (93.79 ± 12.45) μ g/L, (56.9 ± 3.5) %, (60.4 ± 4.8) %] (P < 0.01); 与肾病组相比, 儿茶素治疗组血清 Alb 明显增高, TG 含量明显下降 [(11.28 ± 4.18) g/L vs (1.46 ± 0.71) g/L; (2.89 ± 0.64) mmol/L vs (6.02 ± 0.90) mmol/L; P < 0.01] 与肾病组相比, 儿茶素组大鼠肾脏病理损害明显减轻 (P < 0.05)。结论 儿茶素可通过抑制 TGF- β 1 mRNA 的表达, 降低肾脏局部及血清中活性 TGF- β 1 蛋白表达水平, 减轻肾脏损伤, 改善肾功能, 延缓肾脏病理慢性进展。

[关键词] 肾病综合征 转化生长因子- β 1 儿茶素 原位杂交 大鼠

[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)05-0373-04

Effect of Catechin on Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Rats with the Nephrotic Syndrome

HE Xiao-Jie, LU Xiang-Yang, YI Zhu-Wen, et al.

Department of Pediatric Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To study the effect of catechin on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) expression in rats with the nephrotic syndrome. **Methods** Twenty female SD rats were randomly assigned into the normal control group, un-treated nephrotic group, dexamethasone-treated nephrotic group and catechin-treated nephrotic group. The concentrations of serum albumin (Alb), total protein (TP), trilyceride (TG), blood urea nitrogen (BUN) and TGF- β 1, and the excretion of 24 h urinary protein were detected by the biochemical assay; the TGF- β 1 and TGF- β 1-mRNA expressions in renal intrinsic cells were measured by the immunohistochemical technique and *in situ* hybridization (ISH) respectively; a semiquantitative score was used to evaluate the degree of glomerular and tubulointerstitium. **Results** The serum total TGF- β 1 [(59.40 ± 8.12) μ g/L] and activated TGF- β 1 [(47.56 ± 9.88) μ g/L], TGF- β 1 and TGF- β 1-mRNA expressions in renal intrinsic cells [(45.1 ± 2.0) % and (51.6 ± 3.2) %] in the catechin-treated nephrotic group were lower than those in the un-treated nephrotic group [(127.78 ± 16.11) μ g/L, (93.79 ± 12.45) μ g/L, (56.9 ± 3.5) % and (60.4 ± 4.8) %, respectively] (all P < 0.01). The serum Alb concentration increased significantly and the TG content obviously decreased in the catechin-treated nephrotic group compared with the un-treated nephrotic group [(11.28 ± 4.18) g/L vs (1.46 ± 0.71) g/L; (2.89 ± 0.64) mmol/L vs (6.02 ± 0.90) mmol/L] (both P < 0.01). The pathologic lesions of kidneys were remissive in the catechin-treated nephrotic group compared with the nephrotic group. **Conclusions** Catechin may alleviate kidney lesions and slow down the progression of kidney lesions by inhabiting the expression of TGF- β 1-mRNA and decreasing TGF- β 1 expression in renal intrinsic cells and serum activated TGF- β 1 expression effectively.

[收稿日期] 2002-02-01; **[修回日期]** 2002-08-07

[基金项目] 湖南省科委资助项目 (NO. 00SXY3022)

[作者简介] 何小解 (1970-), 男, 硕士。

Key words: Nephrotic syndrome; Transforming growth factor- β 1; Catechin; In situ hybridization; Rat

以炎症为主的肾小球疾病在早期均伴有明显的肾小球固有细胞的增殖。肾小球固有细胞的异常增殖及其继发的炎症介质的释放,细胞外基质(ECM)的积聚是导致肾小球疾病走向终末期的中心环节之一。目前研究表明,作为一种炎症因子,转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 1在肾脏病的发生与发展中起着十分重要的作用^[1~2]。儿茶素是从天然植物提出的一种非酶抗氧化剂,能有效地清除体内氧自由基,抑制脂质过氧化。为此,我们应用动物试验,通过观察儿茶素对肾病综合征大鼠 TGF- β 1表达的影响,旨在阐明儿茶素延缓肾脏病理慢性进展的部分可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备

20只6周龄的雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(购自中国科学院上海实验动物中心),体重 180~220 g,随机分为正常组、肾病组、激素组、儿茶素治疗组。实验第1天正常组尾静脉1次注射 0.1 ml 生理盐水,其它各组尾静脉1次注射阿霉素(5 mg/kg)。儿茶素治疗组自实验第2周末行儿茶素灌胃每日 500 mg/kg 至第8周末实验结束,激素组自实验第2周末皮下注射地塞米松每日 1.8 mg/kg。实验末收集 24 h 尿标本,腹主动脉取血,分离血清置 -20℃ 冰箱保存备用。取肾脏并将其分成3份标本,行光镜、电镜及免疫荧光检测。

1.2 检测方法

1.2.1 尿蛋白定量及其他生化指标测定 采用传统的考马斯亮蓝法测尿蛋白定量。血清三酰甘油(tri-lyceride, TG)测定采用甘油磷酸氧化酶一步法。白蛋白(albumin, Alb)测定采用溴甲酚绿法,血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)采用脲酶比色法测定。总蛋白(total protein, TP)测定采用双缩脲法(所有试剂盒均购自温州东瓯生物工程有限公司)。

1.2.2 血清中活性 TGF- β 1 的测定 采用双抗体夹心法测定,然后根据标准曲线计算样品中 TGF- β 1 含量,并用考马斯亮蓝 G250(购自 Sigma 公司)测定培养上清的蛋白质浓度作校正。上述方法测定的是样品中活性形式的 TGF- β 1 含量。为测定总的 TGF- β 1 水平,部分血清先经 1 mol/L HCl 酸化处理,15 min 后用 NaOH 中和,使 pH 调至 7.6 后再用于检测。

1.2.3 原位杂交检测 试剂购自武汉博士德生物工程有限公司。探针系地高辛标记的经 *ECOR*I 酶切 TGF- β 1 后 211 bp 的回收片段^[3]。具体操作见如下: 5 μ m 石蜡切片,脱蜡、脱水,封闭,蛋白酶 K 于 37℃ 消化 10 min 后,50℃ 预杂交 1 h,以 0.1 ng/ μ l 的探针 50℃ 杂交 18 h,以 5 $\times$ SSC, 2 $\times$ SSC 及 50% 甲酰胺洗片,10 μ g/ml RNA 酶消化,再以 2 $\times$ SSC, 0.1 $\times$ SSC 洗片,2% 的小牛血清白蛋白封闭 45 min, 1:500 抗地高辛抗体室温 1 h, NBT 及 BCIP 显色。以已知阳性片为阳性对照(阳性为棕紫色)。每个标本分别选取肾小球系膜区、近端肾小管、远端肾小管、肾间质、血管五个部位进行计数,每个部位随机计数 5 个区域,计算其阳性细胞百分率,并取其平均值。

1.2.4 免疫组化检测 ①所有试剂购自武汉博士德生物工程有限公司(一抗系兔抗大鼠,来源于 Santa Cruz Biotechnology 公司,二抗系羊抗兔,来源于 DOKO 公司,显色试剂来源于 Sigma 公司)。②方法:采用 VSAB 法。3 μ m 石蜡切片脱蜡水化后,3% 的盐酸-甲醇-过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,洗涤,微波修复抗原核 10 min,牛血清白蛋白封闭,依次加入一抗、二抗及链霉素/卵白素复合物孵育后, DAB 显色,苏木素复染,树胶封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照,已知阳性片作阳性对照(阳性为黄色)。结果观察同原位杂交。

1.3 肾组织病理学检测及病理积分的评定^[4~7]

1.3.1 肾小球病损害程度的评定 ①系膜细胞增生按每个系膜区系膜细胞数目小于 3 个, 3 个, 4 个及大于 5 个分别计 0 分, 1 分, 2 分, 3 分。②系膜基质增宽程度与毛细血管腔直径及开放程度相比,按毛细血管腔开放良好,基质未见明显增生,基质增生略小于毛细血管腔直径且呈节段性分布,基质增生略大于毛细血管腔直径且呈弥漫性分布,毛细血管腔呈节段性开放不良,基质增生呈弥漫性分布,大部分毛细血管腔开放不良分别计 0 分, 1 分, 2 分, 3 分。③硬化。④基底膜的改变情况。⑤囊壁粘连情况。③、④、⑤按病变范围未见明显改变,病变范围小于 30%, 病变范围在 30%~60% 之间, 病变范围大于 60% 分别计 0 分, 1 分, 2 分, 3 分。

1.3.2 肾小管间质病理损害程度的评定 根据肾小管扩张程度、肾小管萎缩程度、肾小管上皮细胞空泡变性程度、肾小管上皮细胞坏死程度、间质纤维化程度及肾间质炎症细胞浸润程度的无、轻、中、重分别计

0 分、1 分、2 分、3 分。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 8.0 统计软件包进行统计学处理,所有资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组资料间和同组多个时间点间比较,方差齐者,采用 One-Way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐者,采用 Tamhane 分析。对有相关趋势的变量采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 4 组大鼠血清 Alb,BUN,TG,TP 及 24 h 尿蛋白

表 1 4 组大鼠血清 Alb,BUN,TG,TP 及 24 h 尿蛋白定量					
Table 1 Serum concentrations of Alb, BUN, TG and TP and the excretion of					
24 h urinary protein in the four groups					(n=5, $\bar{x} \pm s$)
组别	BUN(mmol/L)	Alb(g/L)	TG(mmol/L)	TP(g/L)	24 h 尿蛋白定量(mg/d)
对照组	4.09 ± 0.11	13.16 ± 1.59	1.58 ± 0.14	18.90 ± 1.15	27.3 ± 5.55
肾病组	11.02 ± 1.37 ^a	1.46 ± 0.71 ^a	6.02 ± 0.90 ^a	11.36 ± 0.99 ^b	410.60 ± 52.55 ^a
激素治疗组	7.01 ± 0.23 ^c	7.56 ± 0.84 ^c	2.98 ± 0.59 ^c	18.37 ± 0.70	310.50 ± 40.50 ^c
儿茶素治疗组	10.80 ± 2.02	11.28 ± 4.18 ^{c,d}	2.89 ± 0.64 ^c	18.90 ± 1.15	411.20 ± 44.52

注: *^a 与对照组比 *^a $P < 0.01$; ^b 与对照组相比 $P < 0.05$; ^c 与肾病组比较 $P < 0.01$; ^d 与激素治疗组比较 $P < 0.05$

2.2 4 组大鼠实验期末肾组织中 TGF-β1,TGF-β1 mRNA、血清中活性 TGF-β1 表达与肾脏病理积分

血清中活性 TGF-β1、总 TGF-β1 的含量以肾病组最高,儿茶素治疗组、激素组较肾病组明显降低(P 分别 $< 0.05, 0.01$);儿茶素治疗组大鼠肾组织中 TGF-β1,TGF-β1-mRNA 表达也明显低于肾病组($P < 0.01$)就肾脏病理积分而言,肾病组、激素治疗

定量的比较

结果显示,与对照组相比,肾病组大鼠血清中 BUN,TG,24 h 尿蛋白定量明显增高(均 $P < 0.01$), Alb,TP 明显降低($P < 0.01$ 或 0.05);与肾病组相比,儿茶素治疗组及激素组血清 Alb 明显增高(均 $P < 0.01$),TG 含量明显下降(均 $P < 0.01$),但 24 h 尿蛋白定量仅激素组有明显下降($P < 0.01$);与激素组相比,儿茶素治疗组血清 Alb 的含量明显增高($P < 0.05$)。见表 1。

组、儿茶素治疗组均较正常组为高($P < 0.01$)。但儿茶素治疗组、激素组病理积分均低于肾病组(P 分别 $< 0.05, 0.01$)。与激素治疗组相比,儿茶素治疗组血清中活性 TGF-β1,总 TGF-β1,肾组织中 TGF-β1,TGF-β1 mRNA 以及病理积分均明显增高($P < 0.01$)。见表 2,图 1~4(见封 III)。

表 2 4 组大鼠实验期末肾组织中 TGF-β1,TGF-β1mRNA 及血清中活性 TGF-β1 表达						
Table 2 Serum activated TGF-β1 expression, and total TGF-β1, TGF-β1mRNA expressions in the four groups						
($\bar{x} \pm s$)						
组别	例数	血清(μg/L)		肾组织(%)		病理积分
		活性 TGF-β1	总 TGF-β1	TGF-β1	TGF-β1-mRNA	
对照组	5	30.34 ± 4.71	42.12 ± 7.81	28.5 ± 2.6	19.4 ± 4.8	1.20 ± 0.45
肾病组	5	93.79 ± 12.45 ^a	127.78 ± 16.11 ^a	56.9 ± 3.5 ^{a,e}	60.4 ± 4.8 ^a	8.80 ± 0.84 ^a
激素治疗组	5	38.24 ± 5.76 ^{b,c}	52.34 ± 9.90 ^{b,c}	37.8 ± 1.8 ^{a,c}	40.1 ± 2.9 ^{a,c}	4.40 ± 0.89 ^{a,c}
儿茶素治疗组	5	47.56 ± 9.88 ^{b,d,e}	59.40 ± 8.12 ^{b,d,e}	45.1 ± 2.0 ^{a,d,e}	51.6 ± 3.2 ^{b,c,e}	6.50 ± 1.00 ^{a,d,e}

注: *^a 与对照组比较 $P < 0.01$; ^b 与对照组比较 $P < 0.05$; ^c 与肾病组比较 $P < 0.01$; ^d 与肾病组比较 $P < 0.05$; ^e 与激素治疗组比较 $P < 0.01$

2.3 血清中 TGF-β1,肾脏局部 TGF-β1,TGF-β1 mRNA 与病理积分的相关分析

相关分析发现,血清中总 TGF-β1 与活性 TGF-β1、肾脏局部 TGF-β1,TGF-β1 mRNA 及病理积分之间

高度正相关(r 分别为 0.676, 0.701, 0.789, 0.684, 均 $P < 0.01$)。

3 讨论

转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 是一种分子量为 25 KD 的多肽二聚体。正常人肾小球内有 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达,它通过对 C-myc 癌基因启动子的反式调控序列的作用而减少 C-myc 基因的表达,并可通过阻止 PRB(视网膜神经胶质瘤蛋白)的磷酸化而使细胞周期停止在 G1 期,达到抑制内皮细胞、系膜细胞、上皮细胞及淋巴细胞的增殖反应。但对系膜细胞的作用却具有双重性,低浓度时促进系膜细胞增殖,高浓度时则抑制系膜细胞增殖。与此同时,高浓度的 TGF- $\beta 1$ 则可刺激肾固有细胞分泌 IV 型胶原、纤维连接蛋白、层粘蛋白及蛋白聚糖等胶原成分,促进细胞外基质的形成。然而尽管肾脏病理慢性进展是由许多因素决定的,但大量研究结果表明,在肾脏病理慢性进展过程中,TGF- $\beta 1$ 是一个关键的炎症细胞因子^[8~10]。因此,若能有效地抑制 TGF- $\beta 1$ 的过度表达,也不乏为延缓肾脏病理慢性进展的重要手段之一。

阿霉素肾病大鼠模型是目前公认的理想人类微小病变肾病模型,在模型初期,其病理表现主要以微小病变为主,随着造模时间的延长,则可出现系膜细胞的增生及系膜基质的增加,进而可导致局灶节段硬化,最终可导致进行性肾小球硬化。本研究发现,实验末,肾病大鼠肾小球病理改变已可见系膜细胞轻度增生及系膜基质轻度增多。肾小管上皮轻度空泡变性,间质可见轻度水肿。并且发现与对照组大鼠相比,其它各组大鼠血清中总 TGF- $\beta 1$ 及活性 TGF- $\beta 1$ 均明显增高,但血清中总 TGF- $\beta 1$ 的增加幅度与活性 TGF- $\beta 1$ 的增加幅度相比无统计学意义(P 均 > 0.05),说明血清中总 TGF- $\beta 1$ 的增加是伴随活性 TGF- $\beta 1$ 增加而增高的。儿茶素治疗组血清中总 TGF- $\beta 1$ 及活性 TGF- $\beta 1$ 虽较激素组为高,但均明显低于肾病组,说明阿霉素肾病时可出现血清 TGF- $\beta 1$ 表达增高,而儿茶素可通过降低血清中活性 TGF- $\beta 1$ 蛋白质表达水平而达到降低血清中总 TGF- $\beta 1$ 水平的目的。在肾组织中,儿茶素治疗组 TGF- $\beta 1$ 及 TGF- $\beta 1$ mRNA 均明显低于肾病组,提示儿茶素尚能低调肾

脏局部 TGF- $\beta 1$ 基因表达而达到下调肾脏局部 TGF- $\beta 1$ 蛋白质的表达水平。相关分析可以看出,血清总 TGF- $\beta 1$ 及活性 TGF- $\beta 1$ 与肾组织中的 TGF- $\beta 1$ 的 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达水平高度正相关,说明儿茶素可能是通过低调阿霉素肾病鼠肾脏局部 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达而达到降低血液中 TGF- $\beta 1$ 的目的。儿茶素组肾脏病理积分与肾病组相比明显减轻,提示抑制 TGF- $\beta 1$ 表达可减轻肾脏损伤。且儿茶素尚可一定程度上降低 BUN、血 TG,上调血 Alb。

综上所述,儿茶素可通过抑制 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达,降低肾脏局部及血清中活性 TGF- $\beta 1$ 蛋白水平,减轻肾脏损伤,改善肾功能,延缓肾脏病理慢性进展。

【参 考 文 献】

- [1] Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF- $\beta 1$ mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation [J]. *Kidney Int*, 1993, 44(2): 313-321.
- [2] Jones CL, Buch S, Post M, et al. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats [J]. *Am J Pathol*, 1992, 141(6): 1381-1396.
- [3] 郑智华,叶任高,余学清,等. 腹膜透析对转化生长因子 $\beta 1$ 在残存肾中表达的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 1996, 12(5): 262-264.
- [4] 吴小川,易著文,何小解,等. 小儿紫癜性肾炎肾脏病理定量分析 [J]. *湖南医科大学学报*, 2000, 25(4): 403-405.
- [5] Donadid JV, Bergstralh EJ, Offord KP, et al. Clinical and histopathologic associations with impaired renal function in IgA nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 1994, 41(1): 65-71.
- [6] 李志辉,易著文,何小解,等. 激素耐药型和激素依赖型肾病患儿肾脏病理计量分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(8): 449-452.
- [7] 何小解,易著文,何庆南,等. 尿中 HBV-DNA 检测在诊断乙型肝炎病毒相关性肾炎中的意义 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2001, 17(2): 127-128.
- [8] Kuncio GS, Neilson EG, Haverly T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. *Kidney Int*, 1991, 39(2): 550-556.
- [9] Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Weber M, et al. Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1992, 2(1): S126-S131.
- [10] Roberts AB, Mcoune BK, Sporn MB. TGF- β Regulation of extracellular matrix [J]. *Kidney Int*, 1992, 41(2): 557-559.

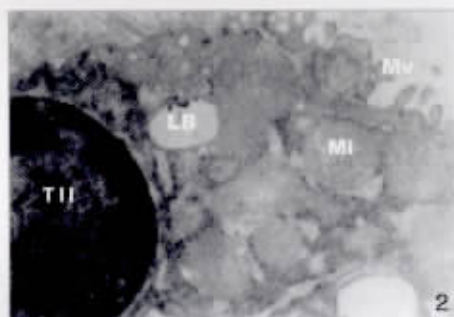
(本文编辑 尹飞)

新生大鼠肺出血动物模型的建立及对临床的启示

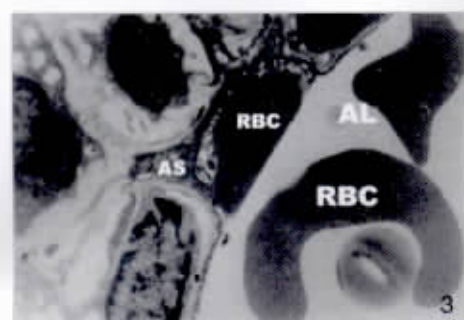
(正文见第357页)



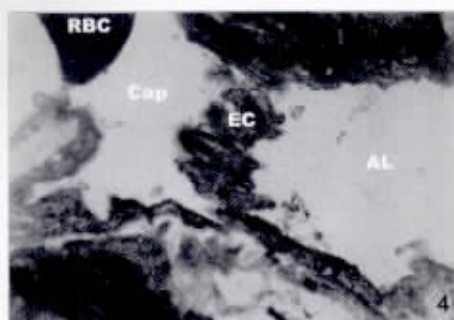
1



2



3



4

图1 大鼠肺肉眼观。病理V级改变。

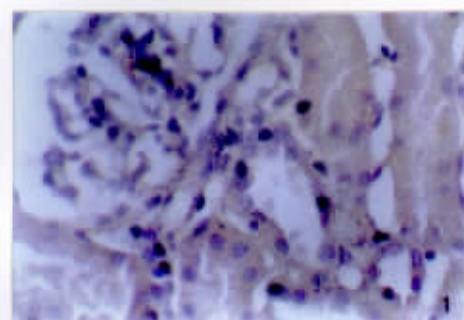
图2 病理Ⅲ级改变。Ⅱ型肺泡细胞(TⅡ)结构($\times 8000$)。线粒体(Mi)肿胀,部分板层小体(LB)排空,微绒毛(Mv)稍减少。

图3 病理Ⅳ级改变。肺泡(AL)及肺间隔(AS)内红细胞($\times 4000$)。

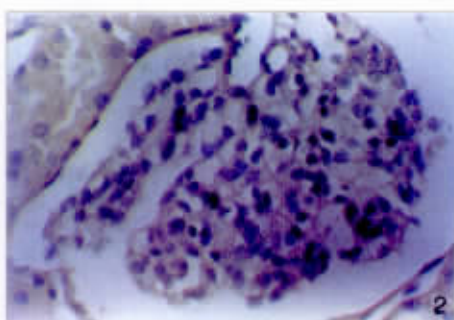
图4 病理V级改变。毛细血管(Cap)超微结构($\times 15000$)。内皮细胞(EC)破坏,连续中断。

儿茶素对肾病综合征TGF- β 1表达的影响研究

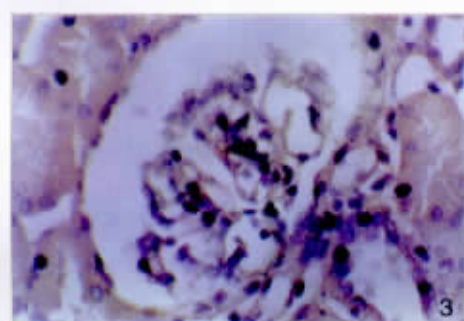
(正文见第373页)



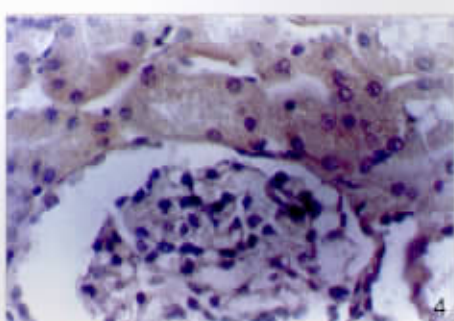
1



2



3



4

图1 正常组大鼠肾固有细胞可见少量TGF- β 1 mRNA表达(ISH, $\times 100$)。

图2 肾病组大鼠实验未肾固有细胞TGF- β 1 mRNA表达较对照组明显增加(ISH, $\times 1000$)。

图3 激素治疗组大鼠实验未肾固有细胞TGF- β 1 mRNA表达较肾病组明显下降(ISH, $\times 1000$)。

图4 儿茶素治疗组大鼠实验未肾固有细胞TGF- β 1 mRNA表达较肾病组明显下降(ISH, $\times 1000$)。

先天性肾病综合征1例

(正文见第372页)



图1 银染色示轻度系膜增生($\times 400$)

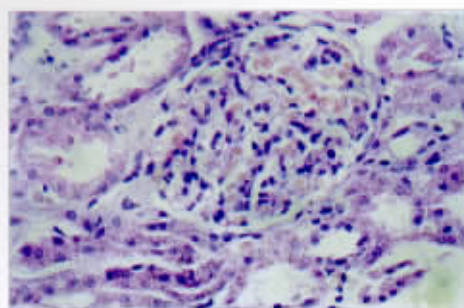


图2 HE染色示轻度系膜增生($\times 400$)