

高迁移率族蛋白 B1 在肾间质纤维化中作用^{*}

李再楠, 赵延娜, 严 瑞, 朱春玲^{**}

(贵阳医学院附院 肾内科, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 观察高迁移率族蛋白 B1 (HMGB 1) 在肾小管间质纤维化大鼠模型中的表达, 探讨肾炎舒对肾小管间质纤维化的疗效及作用机制。方法: 将 36 只大鼠随机分为假手术组、模型组、肾炎舒治疗组 [378 mg/(kg·d)], 采用单侧输尿管结扎术 (UUO) 制作肾小管间质纤维化大鼠模型, 术后第 7 天及第 14 天分别处死各组中 6 只大鼠。检测各组大鼠肾小管间质损害程度及组织中 HMGB 1、转化生长因子-β1 (TGF-β1) 的表达。结果: 模型组 HMGB1、TGF-β1 的表达及肾小管间质损伤指数明显高于同期假手术组 ($P < 0.05$), 肾炎舒治疗组 HMGB1、TGF-β1 的表达及肾小管间质损伤指数明显低于同期模型组 ($P < 0.05$)。结论: HMGB1 可能协同 TGF-β1 促进肾小管间质纤维化, 肾炎舒胶囊可抑制肾组织中 HMGB1 及 TGF-β1 的表达, 对肾间质纤维化有一定的防治作用。

[关键词] 高迁移率族蛋白质类; 转化生长因子 β; 肾间质纤维化; 输尿管梗阻; 肾炎舒; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R692.2; R692.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)05-0465-05

The Effect of High Mobility Group B1 in Renal Interstitial Fibrosis

LI Zainan, ZHAO Yanna, YAN Rui, ZHU Chunling

(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China.)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of high mobility group protein B1 (HMGB1) in rat model of renal tubule interstitial fibrosis (RIF), and to observe the curative effect of Shenyanshu (a traditional Chinese medicine) on renal interstitial fibrosis. **Methods:** Thirty-six normal male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham-operated control group (group SC), RIF model group (group RM) and Shenyanshu treatment group (group ST), and RIF rat model was established by unilateral urethral obstruction (UUO). Rats of the 3 groups were sacrificed on the 7th day and 14th day after surgery. The expression of HMGB1 and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in renal tissue and the extent of tubulointerstitial damage were detected by immunohistochemistry method. **Results:** The expression of HMGB1 and TGF-β1, and the tubulointerstitial damage indexes were significantly higher in group RM than in group SC ($P < 0.05$), and were significantly lower in group ST than in group RM ($P < 0.05$). **Conclusion:** HMGB1 can cooperate with TGF-β1 to accelerate renal interstitial fibrosis. Shenyanshu may inhibit the expression of HMGB1 and TGF-β1 in renal tissue, and in this way, it might have some preventive effect to renal interstitial fibrosis.

[Key words] high mobility group proteins; transforming growth factor beta; renal interstitial fibrosis; ureteral obstruction; Shenyanshu; rats, Sprague-Dawley

多种肾脏疾病通过肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 这个共同通路发展至终末期肾脏病, 引起肾脏功能衰竭。因此, RIF 机制的研究

对慢性肾功能衰竭的防治有重要意义。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB 1) 是哺乳动物体内一种重要的分子, 参与核小体结构的构建及稳定, 并可结合某

^{*} [基金项目] 贵州省科技厅社发攻关项目, 黔科合 SY 字 [2011] 3052 号。

^{**} 通信作者 E-mail: gyzcl@medmail.com.cn

些转录因子参与基因转录及 DNA 重组、修复和复制。近年的研究表明, HMGB 1 还可介导炎症反应, 与肝、肺纤维化具有密切联系^[1], 但在 RIF 中的作用尚未见相关研究报道。肾炎舒是一种临床常用药, 有抗炎、促进炎症恢复作用, 可减轻肾小球肾炎的病理改变, 促进病变恢复, 临床上常用于治疗急性慢性肾炎, 具有较好的疗效, 但是其在 RIF 中的作用尚未见有报道。本实验通过经典的单侧输尿管结扎术(unilateral ureteral obstruction, UUO)制作肾小管间质纤维化模型, 观察 HMGB 1 与肾小管间质损伤、肾间质纤维化的关系以及肾炎舒对 RIF 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

36 只雄性成年 SD 大鼠(清洁级, 由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK 2007-0005), 体重 180 ~ 220 g, 适应性饲养一周后随机分为 3 组, 每组 12 只。假手术组(S 组)做手术但不结扎输尿管、模型组(U 组)和治疗组(T 组), 用 UUO 方法制作肾小管纤维化模型^[2]; 手术后第 1 天开始, T 组予肾炎舒按 378 mg/kg 灌胃, 每天一次, S 组及 U 组以等量生理盐水灌胃。3 组大鼠随机分为 S₇、S₁₄、U₇、U₁₄、T₇、T₁₄ 两个亚组, 各组取 6 只分别于术后第 7 天及第 14 天处死, 观察实验指标。

1.2 试剂

兔抗大鼠 HMGB1、兔抗大鼠 TGF- β 1、生物素标记羊抗兔 IgG 及 DAB 试剂盒, 均由武汉博士德生物技术有限公提供。肾炎舒胶囊批号 100504 (安徽精方药业股份有限公司, 0.35 g/粒), 将胶囊中药物加入双蒸水配成混悬液, 混匀后按 378 mg/kg(按单位体重剂量计算, 大鼠的等效剂量为人的 6.3 倍($6.3 \times 350 \times 4 \times 3/70 = 378$ mg/kg)灌胃, 每日 1 次, 给药时现配^[3]。

1.3 观察指标

1.3.1 肾小管间质的病理改变 分别于术后第 7 天及第 14 天处死大鼠, 取肾脏切片经 HE 染色后, 在 200 倍显微镜下依序分别在左上、左下、右上、右下、中间各取 2 个视野, 共 10 个视野, 依据肾间质纤维化、肾小管萎缩、肾间质细胞浸润、红细胞管型、蛋白质管型、肾间质水肿、肾小管扩张、肾小管细胞空泡变性等 8 项指标来观察肾间质病理改变, 并作肾小管间质损伤指数(tubuloin - terstitial dam-

age index, TDI)评分^[2]。

1.3.2 免疫组织化学检测 肾脏 HMGB1 和 TGF- β 1 表达经 DAB 显色, 组织染上棕黄色或棕褐色为阳性表达, 免疫组织化学结果分析应用计算机 Biomias 2001 图像分析系统, 在 400 倍 OLYMPUS (BX 50) 光学显微镜下, 每例标本分别随机选取 5 个视野, 每个视野选取 5 个阳性区域用目标测量法测量计算其平均灰度值。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件包对数据进行统计学分析处理, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。方差齐者, 多组间采用单因素方差分析组间两两比较用 LSD 法; 如方差不齐, 采用 Tamhanes T2 法; 各项指标之间做 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏病理学改变

肉眼观察: S 组各时间点肾脏大小形态正常, 颜色暗红, 未见明显改变; U 组、T 组中的 U₇、T₇ 组可见梗阻侧肾脏肿大, 颜色变浅, 肾实质变薄; U₁₄、T₁₄ 组梗阻侧肾脏明显肿大, 颜色变浅, 有囊性感, 内含褐色浑浊液体, 肾实质明显变薄。HE 染色 S 组偶见肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cells, RIEC)空泡变性, 灶状单核细胞浸润, 各时间点肾脏病理未见明显改变。U₇ 组肾小管上皮细胞弥漫性空泡变性, 肾间质炎性细胞局灶浸润, 肾小管轻度扩张, 肾间质轻度纤维化, 部分小管腔内可见蛋白管型; U₁₄ 组肾小管间质病变重, 肾间质炎性细胞仍呈弥漫性浸润, 肾小管重度扩张, 肾间质明显纤维化。与 U 组相比, T 组各时间点 TDI 降低, 但仍高于 S 组($P < 0.05$); T₇ 组与 T₁₄ 组比较, TDI 降低。见表 1 及图 1。

表 1 各组大鼠 TDI 比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of tubulointerstitial damage indexes in each group

组别	n	TDI(分)	
		第 7 天	第 14 天
S 组	6	0.64 \pm 0.42	0.73 \pm 0.51
U 组	6	13.00 \pm 0.79 ⁽¹⁾	18.13 \pm 1.23 ⁽¹⁾⁽³⁾
T 组	6	7.83 \pm 0.42 ⁽¹⁾⁽²⁾	11.83 \pm 0.65 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注: ⁽¹⁾ 与同期假手术组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与同期模型组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾ 与同组术后第 7 天比较, $P < 0.05$ 。

2.2 HMGB 1 表达

S 组各时间点 RTEC 中 HMGB 1 少量表达,U 组和 T 组 HMGB 1 除在 RTEC 中表达外,间质细胞也有表达;与同期 S 组相比,U 组及 T 组各时间点 HMGB 1 表达量增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),并随着梗阻后时间延长而增加;与同期 U 组相比,T 组各时间点肾组织中 HMGB 1 表达量减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);T₁₄组与 T₇ 组相比肾组织中 HMGB 1 表达量增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2,表 2。

表 2 各组大鼠 HMGB 1 灰度值($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Grey values of HMGB1 in each group

组别	n	HMGB1(术后)	
		第 7 天	第 14 天
S 组	6	155.13 ± 5.17	153.03 ± 8.34
U 组	6	86.16 ± 5.78 ⁽¹⁾	79.24 ± 5.15 ⁽¹⁾⁽³⁾
T 组	6	132.71 ± 6.44 ⁽¹⁾⁽²⁾	119.88 ± 4.59 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注:⁽¹⁾与同期假手术组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与同期模型组比较, $P < 0.05$;⁽³⁾与同组术后第 7 天比较, $P < 0.05$ 。

2.3 TGF-β1 表达

TGF-β1 在 S 组各时间点仅 RTEC 中有微弱表达,U₇ 组及 T₇ 组可见部分 RTEC 和肾间质细胞有表达,U₁₄组、T₁₄组 RTEC 和肾间质细胞均有大量表达。但 T 组各时间点 TGF-β1 的表达与同期 U 组相比较均降低 ($P < 0.05$)。见图 3 及表 3。

表 3 各组大鼠 TGF-β1 灰度值($\bar{x} \pm s$)
Tab. 3 Grey values of TGF-β1 in each group

组别	n	TGF-β1(术后)	
		第 7 天	第 14 天
S 组	6	153.12 ± 6.31	153.65 ± 7.16
U 组	6	86.75 ± 6.65 ⁽¹⁾	78.78 ± 4.11 ⁽¹⁾⁽³⁾
T 组	6	133.53 ± 6.75 ⁽¹⁾⁽²⁾	119.83 ± 4.52 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注:⁽¹⁾与同期假手术组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与同期模型组比较, $P < 0.05$;⁽³⁾与同组术后第 7 天比较, $P < 0.05$ 。

2.4 TDI 与肾小管间质中 TGF-β1、HMGB 1 表达的相关性

对 U 组术后第 14 天肾小管间质中 TGF-β1、HMGB 1 表达与 TDI 进行相关分析发现,TDI 与 HMGB1、TGF-β1 平均灰度值呈负相关 ($r = -0.966, r = -0.966, P < 0.01$),TDI 与 HMGB1、TGF-β1 的表达呈正相关,TGF-β1 表达与 HMGB1 表达呈正相关 ($r = 0.999, P < 0.01$)。

3 讨论

RIF 几乎是所有慢性肾脏疾病发展的最终结果,它是一个多因素驱动病理过程,涉及炎症、氧化应激、多种细胞因子的作用及信号级联、细胞凋亡、成纤维细胞增殖和活化,导致上皮细胞向成纤维细胞转化。肾小管间质纤维化程度预示着肾功能受损的程度,决定慢性肾脏病患者的预后,其影响程度较肾小球病变的严重程度更为重要。炎症反应是肾间质纤维化发生、发展的重要环节,是各种细胞、细胞因子、炎性介质等诸多因素共同作用的过程。细胞因子在肾间质纤维化中发挥重要作用,细胞因子的作用可分为促进纤维化和抑制纤维化两种。在病理情况下,促进纤维化作用制约抑制纤维化作用,则会促进纤维化的形成。HMGB 1 是一种非组蛋白核内结构蛋白,属于高迁移率族蛋白(HMG)家族中的 HMGB 亚家族,近年研究发现 HMGB 1 被释放到细胞外时可作为一种有效的炎症介质诱发和进一步扩大炎症反应^[5]。内毒素血症时,革兰阴性细菌所释放的脂多糖(LPS)及前期炎症因子 TNF-α、IL-1、INF-γ 等的释放可刺激诱导单核/巨噬细胞主动分泌 HMGB 1,并且坏死组织细胞也可以被动释放 HMGB 1,而 HMGB 1 的细胞外释放又进一步促进炎症细胞释放大量的前期炎症因子从而引发级联炎症反应。目前认为, HMGB 1 有可能成为抗炎和防止组织损伤的重要靶点^[1]。

研究发现,晚期糖基化终产物受体(RAGE)是 HMGB 1 的主要受体,两者结合后最终通过活化核转录因子-κB((nuclear transcription factor-κB, NF-κB)通路介导炎症效应^[6-7]。姚等^[8]的研究发现 NF-κB 可能直接或间接参与 HMGB1 诱导信号调控过程,NF-κB 在诸多免疫炎症相关基因(如 TNF、IL-1β、MCP-1、TGF-β1、MMP-9 等)的转录调控中起决定作用^[9];抑制 NF-κB 的活性可以减少近端肾小管上皮细胞中致纤维化因子 TGF-β1 的基因转录^[10]。实验证明炎症因子和 TGF-β1 能够刺激单核巨噬细胞,诱导细胞内源性地表达和释放 HMGB 1^[11]。本实验观察到 HMGB 1、TGF-β1 在 S 组肾小管间质中有少量表达,U 组的 HMGB 1、TGF-β1 表达增多与 S 组相比有显著性差异,经治疗后 HMGB 1、TGF-β1 表达降低。T 组与 U 组相比具有显著性

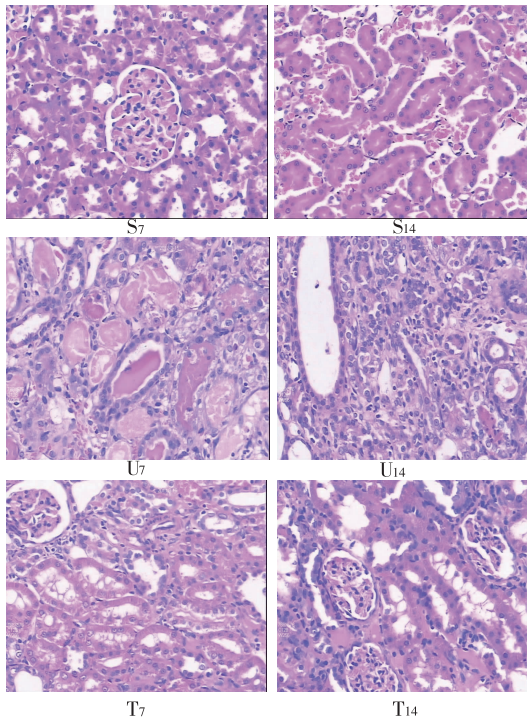


图 1 HE 染色肾组织(×200)

Fig. 1 Renal tissue sections with HE staining

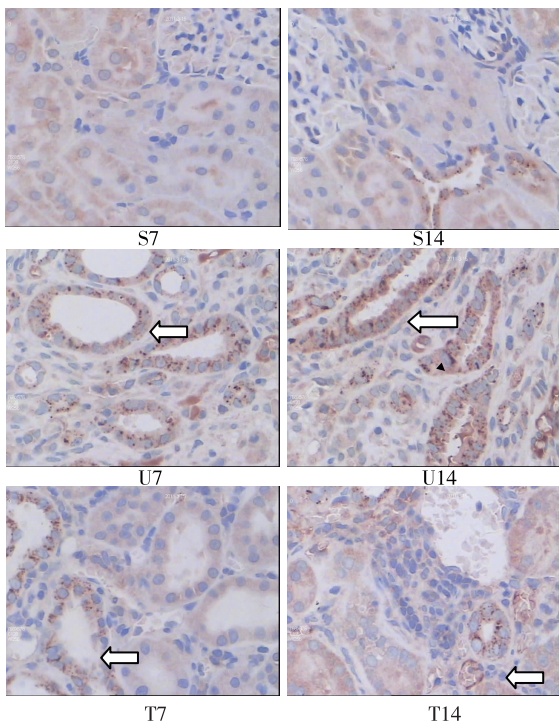


图 2 肾脏 HMGB1 的表达(×400)

Fig. 2 Expression of HMGB1 in kidney

差异,且两者的表达呈正相关,而 TDI 与 HMGB 1、TGF- β 1 的表达亦呈正相关。推测可能在炎症损伤

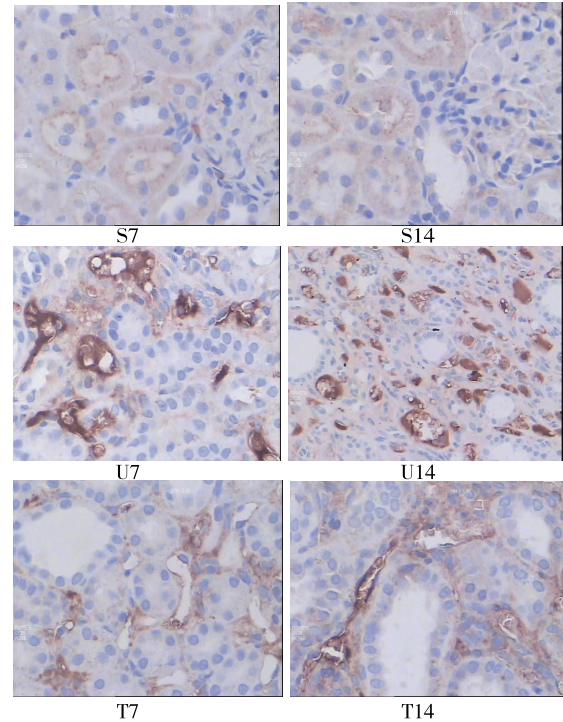


图 3 肾脏 TGF- β 1 的表达(×400)

Fig. 3 Expression of TGF- β 1 in kidney

的刺激下,TGF- β 1 刺激单核/巨噬细胞,诱导细胞内源性地表达和释放 HMGB 1,通过活化 NF- κ B 通路,进一步促进各种炎症因子及 TGF- β 1 的表达,并通过激活 α -SMA 的表达,诱导上皮细胞发生上皮-间质细胞转分化(EMT),转化为肌纤维母细胞,进一步促进 RIF 的形成^[3]。

肾炎舒属纯中药制剂,其中苍术、茯苓、白茅根、人参、防己补气健脾利湿,黄精、菟丝子等补肾,金银花、蒲公英清热解毒。药方驱邪扶正固本兼备,可减轻肾小球肾炎的病理改变,促进病变恢复,改善临床症状,提高人体血浆蛋白,对消除蛋白尿、血尿、降低血肌酐、尿素氮有明显的的作用,同时具有保护肾功能作用^[12]。本实验显示,与 U 组相比较,T 组的 TDI、HMGB1、TGF- β 1 均有所下降,说明肾炎舒对 RIF 可能有抑制作用。肾炎舒中茯苓的主要化学成分茯苓多糖可阻止 C₃ 补体免疫复合物的沉积、扩张血管或抗氧化作用抑制 RIF,从而对大鼠肾功能衰竭有明显的治疗作用^[13];人参皂苷为人参的主要活性成分之一,具有促智、抗衰老、抗氧化和提高免疫力等作用,能提高肾脏(肾小球、肾小管)NO 合成酶活性,增加内源性 NO 的合成,并能选择性的抑制 UUO 大鼠肾小管间质细胞的凋亡^[14-15],从而发挥肾脏保护作用。本实验使用肾炎舒灌胃 UUO 术后肾间质纤维化模型大鼠,术后

第 7 天及第 14 天大鼠肾脏病理学改变较模型组减轻、TDI 减小、肾脏组织中 HMGB1、TGF- β 1 表达减少,提示肾炎舒可能通过抑制肾组织中 HMGB1、TGF- β 1 的表达,减轻 RIF,其确切机制尚有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 韩红莉, 卢俊敏, 常蕴青. 高迁移率族蛋白 B1 在肝纤维化发生发展中的作用研究[J]. 长治医学院学报, 2008(5):321-324.
 - [2] 郭碧林, 朱春玲. Egr-1 蛋白、MMP-2、TGF- β 1 在肾小管间质纤维化大鼠中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2013(7):27-33.
 - [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 人民卫生出版社, 2001, 202-203.
 - [4] Marcussen N. Atubular glomeruli and the structural basis for chronic renal failure[J]. Lab Invest, 2004(66):265-284.
 - [5] Fang WH, Yao YM, Shi ZG, et al. The significance of changes in high mobility group - 1 protein mRNA expression in rats after thermal injury[J]. Shock, 2002(4):329-333.
 - [6] Hori O, Brett J, Slattery T, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and CO-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system[J]. J Biol Chem, 1995(270):25752-25761.
 - [7] van Beijnum JR, Buunann WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) [J]. Angiogenesis, 2008(1):91-96.
 - [8] 姚咏明, 盛志勇. 高迁移率族蛋白 - 1 在脓毒症发病中的作用与意义[J]. 解放军医学杂志, 2002(9):753-756.
 - [9] Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Matrix metalloproteinase - 2: mechanism and regulation of NF- κ B-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion [J]. Glycoconj J, 2007(8-9):429-441.
 - [10] HAN HJ, OH YJ, LEC TJ. Effect of albumin on 14c - alpha Methyl-D- glucopyranoside uptake in primary cultured renal proximal tubule cells: involvement of PLC, MAPK, and NF- κ B [J]. Cell Physiol, 2005(1):246-254.
 - [11] Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, et al. Increased expression of the DNA binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004(12):232.
 - [12] 李瀛. 肾炎舒片减轻甘露醇肾毒性作用的临床观察[J]. 医学理论与实践, 2001(7):582.
 - [13] 杨中浩, 陈群, 焦庆才. 茯苓多糖硫酸酯 L-鸟氨酸盐对腺嘌呤致大鼠肾衰竭的防治作用[J]. 中国药理学杂志, 2008(1):31-35.
 - [14] Sang WH, Hyeyotmg K. Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1996(5):573-580.
 - [15] 郝丽娜, 陈剑珩, 龙江, 等. 人参皂甙 Rg1 对梗阻肾细胞凋亡及 Bcl 2 表达作用的研究[J]. 昆明医学院学报, 2003(24):28-31.
- (2013-07-24 收稿, 2013-09-10 修回)
编辑: 潘 娅
-
- (上接第 464 页)
- [12] Neumann AK, Yang J, Biju MP, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005(47):17071-17076.
 - [13] He LF, Wang TT, Gao QY, et al. Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells [J]. J Biomed Sci, 2011(39):145-151.
 - [14] Loretz CA, Pollina C, Hyodo S, et al. Extracellular calcium sensing receptor distribution in osmoregulatory and endocrine tissues of the tilapia [J]. Gen Comp Endocrinology, 2009(2):216-228.
- (2013-07-12 收稿, 2013-08-01 修回)
编辑: 周 凌