DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.017
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1738 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1738-04

大豆异黄酮对UUO大鼠TGF-β_1的抑制作用

滕丽新[1],张 璟[1],刘胜学[2],曹 佳[2] (第三军医大学:[1]新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037,[2]预防医学院卫生毒理学教研室,重庆市卫生毒理学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大豆异黄酮对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠梗阻肾脏肾间质纤维化的防治作用及机制。方法 观察大鼠结扎侧肾脏的病理改变,应用HE和PAS染色观测肾间质容量,应用RT-PCR法检测肾组织内TGF-β_1 mRNA的表达。结果 异黄酮组梗阻肾肾间质容量明显低于对照组;异黄酮组TGF-β_1 mRNA表达明显低于对照组,统计学分析差异显著($P<0.05$),异黄酮组肾间质纤维化程度轻于对照组。结论 大豆异黄酮对UUO大鼠梗阻肾肾间质纤维化有一定的抑制作用,其机制与大豆异黄酮可抑制TGFβ_1mRNA的表达有关。

关键词:肾间质纤维化;大豆异黄酮;单侧输尿管梗阻;转化生长因子-β_1
中图法分类号:R392.11;R693.2;R914.4 文献标识码:A

Inhibitory effect of soybean isoflavone genistein on renal TGF-β_1 in rats with unilateral ureteral obstruction

TENG Li-xin[1], ZHANG Jing[1], LIU Sheng-xue[2], CAO Jia[2] ([1]Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Hygiene Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the preventive effect of soybean isoflacone genistein on rats with unilateral ureteral obstruction (UUO) and the related mechanisms. Methods Rats were randomly divided into the following groups: sham-operation (group S, $n=18$), UUO group (group C, $n=30$), and geinstein treatment group (group G, $n=42$, at the dose of 200 mg·kg^{-1}·d^{-1}). At 5, 10, 15, 20, 25, and 30 d after operation, the pathological changes of the ligated kidneys were observed and the expression of mRNA of TGF-β_1 in renal tissues was examined by RT-PCR. Results Genistein treatment significantly reduced the section percentage of interstitial fibrosis in ligated kidneys at different time after operation ($P<0.05$). The expression of TGF-β_1 mRNA in group G decreased at 5—30 d after UUO. The quantity of TGF-β_1 in rats in group G was lower than that in group C at 5—25 d ($P<0.05$). Conclusion Soybean isoflacone genistein could inhibit the development of renal interstitial fibrosis in the UUO model. The mechanism might be associated with the inhibitory effect of genistein on the expression of TGF-β_1 mRNA.

Key words: renal interstitial fibrosis; genistein; unilateral ureteral obstruction; transforming growth factor-β_1

在各种肾脏疾病发展为肾间质纤维化、肾功能衰竭的过程中,伴随有单核/巨噬细胞在肾间质的浸润,我们在前期研究中也证明了这一点,并发现大豆异黄酮可减轻大鼠梗阻肾巨噬细胞的浸润[1];单核/巨噬细胞是转化生长因子-β_1(TGF-β_1)的主要来源,而TGF-β_1是最重要的促纤维化因子之一[2]。本实验以大鼠单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型为研究对象,研究大豆异黄酮在大鼠肾间质纤维化进程中对TGF-β_1mRNA表达的影响,以探讨大豆异黄酮对肾间质纤维化的抑制作用及其机制。

1 对象与方法

1.1 动物模型建立与实验分组

雄性Wistar大鼠购自第三军医大学实验动物中心,90只6周龄,体质量180~200 g,清洁级。完全随机分为3组:假手术组(sham-operation, S)18只,对照组(control, UUO without genistein, C)30只,异黄酮组(UUO with genistein, G)42只。3组大鼠均采用乙醚吸入麻醉,无菌手术条件下行左侧输尿管下段双线结扎[3],假手术组分离输尿管后不结扎。大豆异黄酮于手术前1天开始饲喂。S组和C组饲喂普通饲料,G组饲喂含大豆异黄酮的饲料,剂量为200 mg·kg^{-1}·d^{-1}[4](大豆异黄酮,由四川广

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(2001)
Supported by the Scientific Research Foundation of Bureau of Public Health of Chongqing (2001)

作者简介:滕丽新(1970—),女,河北省冀县人,博士,医师,主要从事肾间质纤维化机制方面的研究。电话:(023)68752589

收稿日期:2003-09-17;修回日期:2003-11-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

汉生化制药公司馈赠)。

1.2　标本收集

分别于手术后第 5、10、15、20、25、30 天处死 3 组大鼠, 每次 15 只: S 组 3 只, C 组 5 只, G 组 7 只。观察双侧肾脏组织的外观变化, 取梗阻侧肾脏部分经 10% 中性甲醛固定, 行 HE 和 PAS 染色检查, 其余液氮冷冻, 用于 RT-PCR 检测 TGF-β_1 mRNA。

1.3　肾脏病理检查

采用双盲法评估, 通过点计数法测量肾间质容量[5], 取 HE 与 PAS 染色的切片, 200 倍光镜下拍摄连续不重叠的肾皮质视野, 将印有 247 个小格(13×19 个样格)的透明胶片叠加在每张照片上, 计算肾皮质间质相对容量(Vv), 每个肾脏计算的总点数为2 470个。

1.4　利用 RT-PCR 法测定肾组织中 TGF-β_1 mRNA 的表达

利用 Tripure 分离试剂提取肾组织总 RNA, 在逆转录酶 M-MLV 催化下合成 cDNA, 以适量 cDNA 为模板, 在 TaqDNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。所用引物序列参考文献[6], 由上海生工公司合成。TGF-β_1 引物正链: 5′GGA CTA CTA CGC CAA AGA AG 3′; 负链: 5′TCA AAA GAC AGC CAC TCA GG 3′, 特异扩增片段为 294 bp。内参照 β-actin 特异扩增片段为 237 bp。扩增条件: 97 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 50 s, 55℃退火 60 s, 72 ℃延伸 40 s, 循环数为 30; 72 ℃后延伸 3 min。在紫外灯下检查凝胶并进行照相, 将电泳凝胶置于 Doc Gel 2000 凝胶图像分析系统中定量, TGFβ_1/β-actin 表示 TGF-β_1 的表达量。

1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行双因素方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　肾脏病理改变

2.1.1　大体观察　　对照组和异黄酮组梗阻侧肾脏的体积随梗阻时间的延长而增大, 30 d 时大小约为 3.5 mm×2.0 mm×2.0 mm, 肾内积水, 肾实度变薄, 肾盂扩张, 肾盏乳头受压, 穹窿部乳头变平, 部分成凹形, 乳头缺血萎缩, 积液清亮透明, 偶可见包膜下有点状瘀血。

2.1.2　光镜观察　　HE 及 PAS 染色在对照组梗阻肾脏中可见肾间质水肿、纤维化, 远端肾小管与近曲小管均扩张, 部分萎缩坏死。术后 5 d, 肾小管间质中炎细胞浸润明显增多, 并出现肾小管扩张, 间质增宽, 约占梗阻肾皮质(16.07±8.74)%; 术后 10 d, 集合管扩张, 并有萎缩坏死, 单核细胞与淋巴细胞弥漫性浸润, 肾间质约占梗阻肾皮质(30.01±6.84)%。术后 15 d 近曲小管萎缩, 出现肾间质纤维化, ECM 增生明显, 肾间质约占梗阻肾皮质(48.08±13.76)%; 术后 30 d 髓质厚度减少一半, 肾间质纤维化明显加重, 肾间质约占梗阻肾皮质(75.90±9.26)%, 但肾小球无明显改变。异黄酮组术后 5 d 以肾小管上皮细胞肿胀为主, 肾间质约占梗阻肾皮质(4.80±2.13)%; 术后 10 d 有轻度肾小管上皮萎缩, 肾小管扩张, 间质中有单核细胞浸润, 肾间质约占梗阻肾皮质(11.00±2.19)%; 术后 30 d 肾小管间质轻到中度纤维化, 肾间质约占梗阻肾皮质(29.97±16.16)%, 异黄酮组各时间点肾间质容量均明显低于对照组($P<0.05$), 肾间质纤维化程度轻于对照组(图 1、2)。

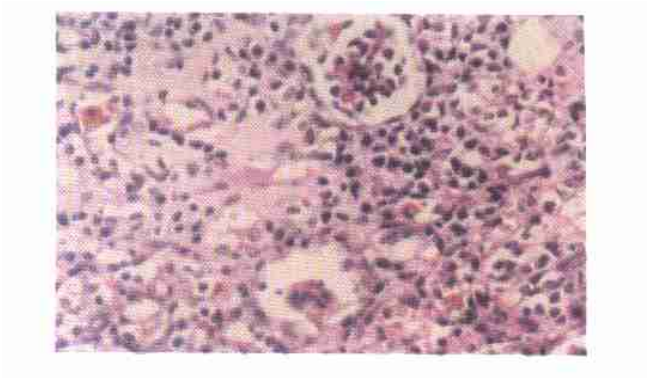


图 1　对照组单侧输尿管梗阻术后 **30 d** 肾病理改变: 可见肾小管间质范围增宽、纤维化, 淋巴细胞浸润, 大量间质细胞增生 (HE× 200)

Fig 1　Tubulointerstitial changes by histological examination at 30 d after UUO surgery in the control group (C): Fibrosis and expanding of the interstitial volume in the renal interstitium, infiltration of mononuclear inflammatory cells in tubular interstitium, and massive amount of interstitial cell hyperplasia (HE× 200)

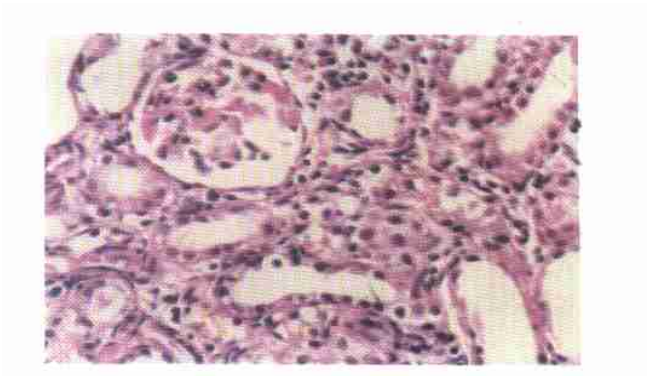


图 2　异黄酮组单侧输尿管梗阻术后 **30 d** 肾病理改变: 主要表现为肾小管扩张, 部分肾小管萎缩、坏死, 有间质细胞增生, 有轻度间质纤维化表现 (HE× 200)

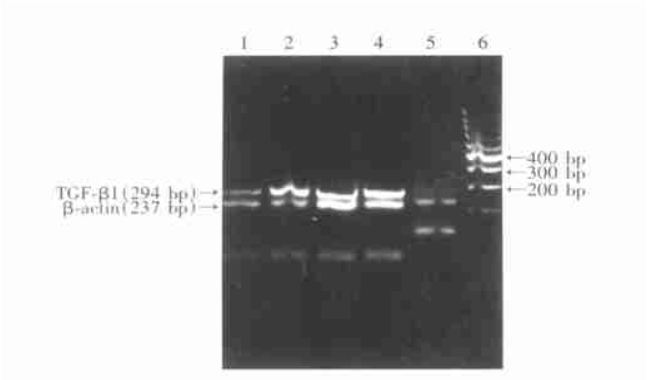
Fig 2　Pathological changes in UUO rats at 30 d after surgery: lots of expanded renal tubules, atrophy and necrosis of a few tubular tubules, interstitial cell hyperplasia, and mild interstitial fibrosis (HE× 200)

2.2　RT-PCR 法测定肾组织中 TGF-β_1 mRNA 的表达

异黄酮组和对照组术后 5 d 与 25 d 梗阻肾 TGF-β_1 PCR 产物的亮度均明显高于假手术组, 在同一时间点异黄酮组梗阻肾 TGF-β_1 PCR 产物的亮度明显低于对照组(图 3)。PCR 产物量以 TGF-β_1 与内参照 β-actin 产物量的比值表示最终结果(表 1), UUO 术后 10~30 d, 异黄酮组和对照组 TGF-β_1 mRNA 表达逐渐升高, 在同一时间点都明显比假手术组高, 统计学分析表明, 与

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

假手术组比较差异非常显著($P<0.01$)。UUO 术后 15～30 d 在同一时间点，异黄酮组 TGF-β_1 mRNA 表达明显低于对照组，统计学分析差异非常显著($P<0.01$)，表明异黄酮可以明显抑制梗阻肾中 TGF-β_1 mRNA 的表达。



1，2：Control group；3，4：Genistein treatment group；5：Sham-operation group；6：Marker

图 3 单侧输尿管梗阻术后 25 d TGF-β_1 RT-PCR 电泳结果

Fig 3 Electrophoretic result of TGF-β1 RT-PCR product at 25 d after UUO surgery (2% agarose gel)

表 1 单侧输尿管梗阻大鼠梗阻肾中 TGF-β_1 的表达情况($TGF\text{-}\beta_1/\beta\text{-}actin$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expressions of TGF-β1 in ligated kidney of the UUO rats ($TGF\text{-}\beta_1/\beta\text{-}actin$，$\bar{x}\pm s$)

Group	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
S	0.37±0.05	0.45±0.15	0.42±0.15	0.33±0.13	0.36±0.13	0.37±0.25
C	1.58±0.80	1.50±0.13★	1.83±0.18★	2.44±0.41★	2.70±0.10★	4.25±0.50★
G	0.73±0.06	1.00±1.17 *	1.00±0.18 *★	1.18±0.07 *	1.48±0.13 *★	2.39±0.18 *★

S：Sham-operation；C：UUO；G：UUO with genistein；★：$P<0.05$，*vs* S；*：$P<0.05$，*vs* C

3 讨论

大豆异黄酮是近年来国内外研究较多的一种具有抗细胞增殖、抗癌与抗衰老作用的非营养成分[7]。大豆异黄酮包括金雀异黄素、大豆甙元及其相应的葡萄糖甙。金雀异黄素是很强的酪氨酸激酶特异性抑制剂[8]，由此酶催化磷酸化的一些蛋白质参与了细胞功能和增殖，例如在细胞周期中，某些蛋白质的酪氨酸残基必须被磷酸化后，细胞才能进入分裂相。研究表明金雀异黄素抑制了 P34cdc2/cyclin 复合物的磷酸化(这是细胞进入 M 期的关键物质之一)和拓扑异构酶的活性[9]。

多种细胞因子均可作用于肾间质成纤维细胞，导致细胞增殖和细胞外基质(ECM)的过度分泌，造成肾间质纤维化，目前认为 TGF-β_1 是众多刺激肾间质纤维化改变的细胞因子中最主要的成员，是梗阻性肾脏炎症与肾脏渐进性纤维化之间的枢纽[10,11]。本实验利用 RT-PCR 法测定 TGF-β_1 mRNA 的表达量，在对照组梗阻肾中发现 UUO 术后 5～30 d，TGF-β_1 mRNA 的表达量维持在较高的水平，同时伴随着梗阻肾肾间质纤维化程度逐渐加重，两者相关性显著。在本实验中给 UUO 模型大鼠喂食大豆异黄酮，发现大豆异黄酮对 TGF-β_1 mRNA 的表达具有一定的抑制作用。Niclas Olsson 等[12]在研究 TGF-β_1 作用的信号传导通路中，以大豆异黄酮作用于人类乳房细胞 HMC-1，发现可阻断 TGF-β_1 的表达及促迁移活化作用，表明酪氨酸激酶是调节 TGF-β_1 作用的信号传导通路中的重要信号分子，这从细胞信号传导通路方面证实了本实验的结果。同时在本实验中还发现，大豆异黄酮可在转录水平抑制 TGF-β_1 的表达，进而延缓了肾间质纤维化的发展。推测大豆异黄酮抑制 TGF-β_1 mRNA 表达可能有如下原因：大豆异黄酮可在转录水平抑制 TGF-β_1 mRNA 的表达；由于单核/巨噬细胞是 TGF-β_1 的主要来源，大豆异黄酮可抑制巨噬细胞浸润[1]，减少 TGF-β_1 的来源细胞，从而进一步减少了 TGF-β_1 mRNA 的表达。同时，我们也发现相应时间点的异黄酮组病理改变也明显轻于对照组，间质纤维化程度轻于对照组，统计学分析差异十分显著，此结果可能与大豆异黄酮抑制了 TGF-β_1 mRNA 的表达，进一步降低其促成纤维细胞活化、增殖和分泌的作用有关，以上还有待进一步研究证实。

本实验表明，大豆异黄酮不仅在 UUO 模型炎性早期对 TGF-β_1 mRNA 的表达有抑制作用，同时在其肾间质纤维化进展期也有抑制作用，而且是在 TGF-β_1 的转录水平抑制其表达，因而我们推测，大豆异黄酮可能对于肾间质纤维化的早期防治具有重要意义，相关的系列研究正在进行中。

(致谢：衷心感谢北京协和医科大学植化室林茂教授、四川广汉市生化制品有限公司总经理吕义长先生和第三军医大学新桥医院肾内科袁发焕教授对本研究的热诚帮助。)

参考文献：

[1] 滕丽新，张 玉景，刘胜学，等. 大豆异黄酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 中华肾脏病杂志，2004，20(1)：67－68.

[2] Sommer M，Eismann U，Deuther-Conrad W，*et al*. Time course of cytokine mRNA expression in kidneys of rats with unilateral ureteral obstruction[J]. Nephron，2000，84(1)：49－57.

[3] 滕丽新，张 玉景，刘胜学，等. 建立大鼠单侧输尿管梗阻模型手术方式的选择[J]. 重庆医学，2002，31(9)：851－852.

[4] Delclos K B，Bucci T J，Lomar L G，*et al*. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (sprague-Dawley) rats

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[J]. Reprod Toxicol, 2001, 15(6): 647—663.
[5] Ishidoya S, Morrissey J, Mccracker R, *et al*. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction[J]. Kidney Int, 1995, 47(5): 1285—1294.
[6] Glumoff V, Makela J K, Vuorio E. Cloning of cDNA for rat pro alpha1 (III) collagen mRNA. Different expression patterns of type I and type III collagen and fibronectin genes in experimental granulation tissue[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1217(1): 41—48.
[7] 郑高利. 大豆异黄酮的药理作用[J]. 中国现代应用药学, 1998, 15(1): 4—5.
[8] Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, *et al*. Genistein a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(7): 2690—2694.
[9] Edgecombe M, Patel R, Whitaker M. A cyclin-abundance cycle-independent p34cdc2 tyrosine phosphorylation cycle in early sea urchin embryos[J]. EMBOJ, 1991, 10(12): 3769—3775.
[10] 王伟铭, 姚 建, 石 蓉, 等. 转化生长因子β_1对肾间质成纤维细胞胶原表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(6): 343—346.
[11] Border W A, Noble N A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis[J]. N Engl J Med, 1994, 331(19): 1286—1292.
[12] Niclas Olsson, Ester Piek, Sundstrom M, *et al*. Transforming growth factor-β-mediated mast cell migration depends on mitogen-activated protein kinase activity[J]. Cellular Signalling, 2001, 13(7): 483—490.

（编辑 陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2004)19-1741-01

个案与短篇

冠状动脉内支架植入对 P 波离散度的影响

Effects of coronary stent implantation on P wave dispersion

郭应先, 刘怀林, 袁义强 （郑州市第七人民医院心血管内科, 郑州 450006）

1998 年 Dilaveris 等首次提出了 P 波离散度(Pd)的概念, 认为 Pd 反映心房非均质性电活动的离散程度, 认为该指标能预测房性心律失常及房颤[1,2]。本研究旨在探讨冠状动脉内支架植入对 Pd 的影响。

1 对象和方法

选择我院 1998 年 4 月至 2002 年 6 月, 作经皮冠状动脉内支架植入术的患者 96 例, 男性 62 例, 女性 34 例, 年龄 39～75 (58.2±12.1)岁。冠状动脉病变: 单支病变 57 例, 双支病变 22 例, 3 支病变 17 例。冠状动脉直径小于 2.5 mm 的病变不做处理, 共植入支架 136 只, 前降支 72 只, 回旋支 35 只, 右冠状动脉 29 只。第 1 次造影时即时植入 31 例, 造影后择期植入 65 例, 其中直接支架植入 29 只, 预扩后支架植入 107 只。所有患者停用抗心律失常药物 5 个半衰期以上。患者术前及术后 24 h 描记同步 12 导心电图, 测量 3 个 P 波, 取其平均值, 每例测量导联不少于 8 个, Pd 为同一患者不同导联中 P 波最大值减于 P 波最小值所得的差值。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用配对 t 检验。

2 结果

术前患者 96 例中 Pd 正常 (＜40 ms)的 39 例(占 40.7%), Pd 异常的(≥40 ms) 57 例(占 59.3%)。冠脉内支架植入后 24 h, Pd 正常组患者的 Pd 值由原来的(25±6.7) ms 缩短至(19±5.7) ms, 无明显差异($P>0.05$); Pd 异常组患者的 Pd 值由原来的(46±13.2) ms 缩短至(37±8.7) ms, 差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

研究资料证明, 心电图的 Pd 是一个新的非创伤性、预测房性心律失常及房颤的指标, 简单易行, 实用性强。当把 Pd≥40 ms 作为预测指标, 预测房颤的敏感性达到 85%, 特异性达到 80%[3,4]。冠心病患者由于心肌缺血导致心肌收缩力下降, 左室增大, 二尖瓣关闭不全, 既而引起左房压力增高, 容积增大, 同时也由于心房肌的缺血导致心房肌纤维化, 心房电活动异常, 从而使 Pd 增大, 引发房性心律失常及房颤。本研究显示在冠心病患者中, 40.7%的患者 Pd 在正常范围内, 59.3%的患者存在 Pd 异常, 与文献[5,6]报道大致相当。冠脉支架植入后 Pd 正常组患者的 Pd 值由术前的(25±6.7) ms 缩短至(19±5.7) ms, 无明显差异; Pd 异常组患者的 Pd 值由术前的(46±13.2) ms 降至(37±8.7) ms, 差异显著。说明冠脉支架植入后心肌供血改善, 心电活动同步性增加, Pd 恢复正常, 有可能减少房性心律及房颤的发生。由于本研究时间较短, 没有冠脉支架植入后是否可以减少房性心律失常及房颤的直接证据。总之, 冠状动脉疾病的患者, 大部分存在心房电活动异常, 冠脉支架植入后, 可使心房肌缺血得到改善, 心房电活动的同步程度增加, P 波离散度降低, 有可能对减少房性心律失常及房颤的发生起到有益的作用。

作者简介: 郭应先(1957—), 男, 河南省巩义市人, 副主任医师, 主要从事心血管病的介入治疗方面的研究, 发表论文 16 篇。电话: (0371)8982509

收稿日期: 2003-10-16; 修回日期: 2003-12-03

（下转 1744 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net