

肾病合剂对阿霉素肾病大鼠肝组织白蛋白基因表达影响的实验研究^{*}

李新民 马 融 鲁 斌 李少川

内容提要 目的 探讨肾病合剂对阿霉素肾病大鼠肝组织白蛋白基因表达的作用。方法 建立阿霉素肾病大鼠模型,采用 Northern 杂交及 Dot-blot 定量分析,观察肝组织白蛋白 mRNA 的表达水平。结果 肾病合剂组大鼠肝组织白蛋白 mRNA 表达均明显高于模型组及正常组 ($P < 0.05$)。结论 肾病合剂可上调阿霉素肾病大鼠肝组织白蛋白 mRNA 的表达水平,促进白蛋白合成。

关键词 肾病合剂 肾病综合征 白蛋白 基因表达

Study on Effect of Nephropathy Mixture on Genetic Expression of Liver Albumin in Rats with Adriamycin-Induced Nephrotic Syndrome LI Xin-min, MA Rong, LU Bin, et al *Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin (300193)*

Objective: To explore the effect of Nephropathy mixture on genetic expression of liver albumin in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. **Methods:** The rat model of adriamycin-induced nephrotic syndrome was established and the liver albumin mRNA expression level was observed with Northern hybridization and Dot-blot quantitative analysis. **Results:** The liver albumin mRNA expression level in the Nephropathy Mixture treated group was significantly higher than that in the model group and the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Nephropathy Mixture could up-regulate the liver albumin mRNA expression level and promote the synthesis of albumin in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome.

Key words Nephropathy mixture, nephrotic syndrome, albumin, gene expression

肾病合剂由黄芪、茯苓、柴胡、白花蛇舌草、益母草等药物组成,具有疏解清化、健脾利湿之功效。临床研究表明,该方治疗小儿肾病综合征,尤其对减少肾病复发具有较好疗效。为进一步探讨其作用机理,本实验采用分子杂交的方法对肾病合剂影响阿霉素肾病大鼠肝组织白蛋白 mRNA 的转录水平进行了研究,现报告如下。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠,体重 170 ~ 200g,由天津药物研究院动物室提供。

2 药物和试剂 肾病合剂(由黄芪 10g 茯苓 10g 柴胡 10g 白花蛇舌草 10g 益母草 10g 等组成)由本院药厂提供,每毫升药液含生药 2g。阿霉素为意大利 Farmitalia 公司产品。富蛋白饲料由军事医学科学院第四研究所配制,蛋白含量 38.9% (其中酶蛋白

18.4%)。 [α -³²P] dNTP 购自北京亚辉生物技术公司, DEPC 为美国 Sigma 公司产品; 异硫氰酸胍、巯基乙酸、十二烷基肌氨酸钠为 Serva 公司产品,随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品。鲑鱼精 DNA、聚蔗糖 Ficoll 400、聚乙烯吡咯烷酮、牛血清白蛋白购自天象人生物技术有限公司,为进口分装试剂。其他试剂为国产分析纯。

3 仪器 高速冷冻离心机, KONTRON CENTRIFUKON T-124; PCR 扩增仪, 美国 EPPENDORF AG9600; 分子杂交仪, 德国 BIOMETRA V-5; 台式冷冻离心机, 德国 UNIVERSAL 16R。

4 实验方法

4.1 引物设计 大鼠白蛋白 (ALB) 及 β -actin cDNA PCR 引物由中国科学院北京微生物所合成。大鼠 ALB 引物设计为 Lower primer: 5' GATATCAGAGTGAAGGTGAAGG 3'; Upper primer: 5' CAGCCTCTTGTA-GAAGAACC3'。扩增片段长为 407bp。 β -actin 引物设计为: Lower primer 5' CCATCTCTTGCTCGAAGTCTA-G3'; Upper primer 5' GTATGCCTCTGCTCGTACC-AC3', 扩增片段长为 256bp。

^{*} 天津市自然科学基金资助项目 (No. 941409019)

天津中医药大学第一附属医院 (天津 300193)

表 1 3 组大鼠尿蛋白定量、血浆蛋白、胆固醇及肌酐含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	尿蛋白(mg/24h)				血浆总蛋白	白蛋白	胆固醇	肌酐
	第 2 周末	第 3 周末	第 4 周末	第 5 周末	(g/L)		(mmol/L)	(μmol/L)
肾病合剂	107.4 ± 38.0 ** (10)	112.2 ± 67.9 ** △△ (9)	149.1 ± 40.5 ** △△ (9)	177.3 ± 70.1 ** △△ (9)	70.33 ± 5.17 * △△ (9)	28.13 ± 2.56 ** △△ (9)	2.98 ± 1.27 ** △△ (9)	59.22 ± 7.91 (9)
模型对照	115.0 ± 32.2 ** (8)	234.7 ± 58.4 ** (7)	428.5 ± 76.1 ** (7)	512.1 ± 98.9 ** (7)	43.21 ± 2.51 ** (7)	20.01 ± 1.09 ** (7)	7.23 ± 1.58 ** (7)	64.10 ± 6.56 (7)
正常对照	7.8 ± 1.0 (10)	8.0 ± 1.3 (10)	7.5 ± 1.8 (10)	6.7 ± 1.4 (10)	76.04 ± 4.82 (10)	34.50 ± 1.77 (10)	1.36 ± 0.47 (10)	66.81 ± 6.81 (10)

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$;()内为样本数,下表同

4.2 造模及分组 从30只符合条件的SD大鼠中,随机选取 10 只为正常对照组,其余 20 只进行模型制作,根据 Bertani 氏方法⁽¹⁾改良,即 7.5mg/kg 阿霉素分 2 次尾静脉注射,第 1 次注射 4mg/kg,时隔 1 周,第 2 次注射 3.5mg/kg。于第 1 次注射阿霉素起,所有动物均予富蛋白饮食,于第 2 次注射阿霉素之次日,将模型大鼠按体重排序,随机分为模型对照、肾病合剂两组。分组当日开始灌胃,肾病合剂组每日每只予肾病合剂 25g/kg,其他两组每日每只予生理盐水 2ml。各组大鼠于第 2、3、4、5 周末进行 24h 尿蛋白定量,第 5 周末取血、肝组织标本。

5 观察项目及检测方法 (1)尿蛋白定量采用磺柳酸比浊法⁽²⁾; (2)血浆白蛋白、总蛋白、胆固醇、肌酐分别采用溴甲酚绿法⁽²⁾、双缩脲法⁽²⁾、胆固醇氧化酶法⁽²⁾、苦味酸速率法⁽²⁾测定; (3)肝组织总 RNA 提取采用异硫氰酸胍一步法⁽³⁾; (4)ALB 及 β -actin mRNA 定量分析采用点杂交方法⁽⁴⁾。RNA 样品点于尼龙膜上,点样量分别为每孔 1 μ g、2 μ g 和 5 μ g,杂交后经放射自显影及 LKB 光密度扫描,在 cDNA 探针与 RNA 结合量具有线性关系的条件下,对 ALB 及 β -actin mRNA 进行定量分析。RNA 电泳采用甲醛变性凝胶电泳法,上样量为每孔 20 μ g,然后转移至尼龙膜上,杂交方法与斑点印迹杂交相同,放射自显影得杂交结果。

6 统计学方法 采用 t 检验。

结 果

1 各组大鼠尿蛋白定量、血浆蛋白、胆固醇及肌酐含量比较 见表 1。自第 4 周开始,模型对照组大鼠水肿明显,而肾病合剂组大鼠无明显水肿。肾病合剂可明显减少模型大鼠尿蛋白丢失,提高血浆白蛋白、总蛋白含量,降低血胆固醇含量。

2 大鼠肝组织白蛋白 mRNA 的表达
2.1 Northern 杂交 见图 1,大鼠肝组织白蛋白 mRNA 位于 2.1kb 处,模型对照组及肾病合剂组明显高于正常对照组,其中肾病合剂组表达量最高。

2.2 Dot-blot 杂交结果 见图 2,定量分析结果见表 2。肾病大鼠肝组织白蛋白 mRNA 水平达正常对照组的 2.01 倍。肾病合剂增加肾病大鼠肝组织白蛋白 mRNA 水平至正常对照组的 2.67 倍,达模型对照组的 1.33 倍。经 t 检验,各实验组 ALB/ β -Actin 均高于正常对照组($P < 0.01$),肾病合剂组显著高于模型对照组($P < 0.01$)。可见,肾病合剂可增加阿霉素肾病大鼠肝组织白蛋白 mRNA 的表达水平。

表 2 3 组大鼠肝组织白蛋白 mRNA 的定量分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALB	β -Actin	ALB/ β -Actin
		(伏·秒)		
肾病合剂	9	0.743 ± 0.162	0.435 ± 0.147	1.835 ± 0.387 ** △△
模型对照	7	0.594 ± 0.162	0.446 ± 0.151	1.378 ± 0.267 **
正常对照	10	0.346 ± 0.067	0.486 ± 0.127	0.686 ± 0.158



图 1 3 组大鼠肝组织白蛋白 mRNA Northern 杂交结果

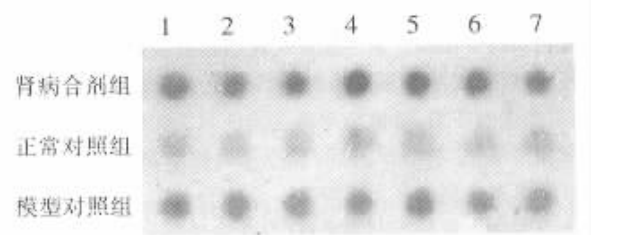


图 2 3 组大鼠肝组织白蛋白 mRNA 斑点印迹杂交结果
注:点样量为每孔 2 μ g;上排数字为动物序号

讨 论

蛋白质代谢紊乱是肾病综合征的重要表现。由于大量蛋白从尿中丢失,血浆蛋白降低,机体会出现代偿

性蛋白合成增加⁽⁵⁾。肝脏是白蛋白合成的主要场所。本实验结果也表明,阿霉素所致肾病大鼠在高蛋白饮食基础上,其肝组织白蛋白 mRNA 转录水平增加到正常对照组的 2.01 倍,但这种白蛋白合成增加是伴有大量尿蛋白情况下的病理表现。可见,提高血浆蛋白的主要手段是控制尿蛋白丢失,同时,还应寻找促进机体蛋白合成、减少蛋白分解的药物。

本研究结果表明,肾病合剂可明显减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白的丢失,同时,还可使肾病大鼠肝白蛋白 mRNA 表达水平显著上调。可见,肾病合剂提高血浆白蛋白水平的作用机制,除了对肾脏的直接作用而减少蛋白尿排泄外,还与其促进肝组织白蛋白 mRNA 表达,增加白蛋白合成有关。结合临床,肾病合剂改善患儿体质、增强机体抗病能力、减少感染、降低肾病复发

的作用,可能与这方面的机制密切相关。

参 考 文 献

1. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Lab Invest* 1982 ;46:16.
2. 李影林. 中华医学检验全书. 上卷. 北京:人民卫生出版社, 1996:643—645,465,702—703,727.
3. Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ, et al. Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979 ;18:5294.
4. Inoue H, Noguchi T, Tanaka T. Rapid regulation of L-type pyruvate kinase mRNA by fructose in diabetic rat liver. *J Biochem* 1984 ;96:1457.
5. 王海燕. 肾脏病学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1996:551—553.