



褪黑素对大鼠纤维化 TGF- β_1 /Smads 信号通路干预研究

孙 旭¹, 张 哲¹, 孙 琛¹, 张 辉¹, 温巨明¹, 丁海麦²

(1. 包头医学院 乌兰察布临床学院, 内蒙古 包头 014040; 2. 包头医学院 基础医学与法医学院, 内蒙古 包头 014040)

摘要:褪黑素是一种主要由松果体分泌的多效性神经激素,具有多种生物学功能,包括抗氧化应激、抗炎、抗凋亡和抗肿瘤特性,以及调节昼夜节律。为探寻临床治疗肾间质纤维化的新途径,本试验观察褪黑素对单侧输尿管梗阻(UUO)构建大鼠肾纤维化模型 TGF- β_1 /Smads 信号通路影响,探讨其干预对肾纤维化机制,SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、UUO 模型(UUO)组、UUO+5 mg·kg⁻¹褪黑素组、UUO+10 mg·kg⁻¹褪黑素组、UUO+15 mg·kg⁻¹褪黑素组,每组 6 只。均于手术当天晚上灌胃给药,每 24 h 1 次。14 d 处死大鼠,取血清检测血肌酐、尿素氮,肾组织进行 Masson 染色,观察病理结果,实时定量 PCR 检测肾组织 TGF- β_1 、Smad₃、Smad₇ 和 Collagen Type I mRNA 表达。结果表明:褪黑素减轻肾组织纤维化病理损伤,使肾组织 TGF- β_1 、Smad₃、Collagen Type I mRNA 表达降低,Smad₇ mRNA 表达升高($P<0.05$,部分 $P<0.01$),以 15 mg·kg⁻¹改善效果最佳。褪黑素可呈剂量相关性下调 TGF- β_1 、Smad₃、Collagen Type I 及上调 Smad₇ 来抑制 TGF- β_1 /Smads 信号通路,从而发挥肾间质纤维化作用。

关键词:褪黑素;肾间质纤维化;TGF- β_1 ;Smad₃;Smad₇

肾脏纤维化是引发终末期肾功能衰竭的主要原因之一。目前临床上主要通过控制加剧肾功能恶化的危险因素来防治肾脏纤维化,但患者预后改善并不显著^[1-2]。目前普遍认为,TGF- β_1 是导致肾纤维化发病的关键因子,TGF- β_1 与受体结合后经过依赖于 Smads 的信号途径调控肾病病理生理学发生^[3-4]。褪黑素(MEL)是一种主要由松果体分泌的多效性神经激素,它的产生遵循昼夜节律,在夜间达到峰值,而白天当光线关闭时,浓度相对较低。新生儿褪黑素峰值水平较高,老年人开始下降。研究表明,褪黑素具有多种生物学功能,包括抗氧化应激、抗炎、抗凋亡和抗肿瘤特性,以及调节昼夜节律^[5]。Choi H S 等^[6]用褪黑素处理 CCl₄ 诱导的肝纤维化大白鼠模型,褪黑素试验组与对照组相比肝脏羟脯氨酸含量、肝细胞损伤、TGF- β_1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达显著降低;同时,试验组肝脏中 NF- κ B 的表达受到抑制,纤维化大鼠中 Kupffer 细胞的促炎细胞因子

TNF- α 和 IL-1 β 明显减少。褪黑素能否调节 TGF- β_1 /Smad₃ 通路保护肾脏仍未知。本试验通过单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠观察褪黑素对间质纤维化影响,探讨褪黑素能否通过 TGF- β_1 /Smad₃ 通路发挥抑制纤维化作用,为临床治疗肾间质纤维化寻找新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试鼠为健康雄性 SD 大鼠 45 只,7 周龄,体重(180.20±8.35)g,购自内蒙古大学动物饲养室。人工光照、阴暗各 12 h,45% 左右相对湿度,25℃ 恒温的普通设施中,给予标准的颗粒饲料,适应性喂养 7 d。

供试戊巴比妥钠由包头医学院机能实验室提供;褪黑素(Melatonin, MEL)为 Sigma 公司生产;总 RNA 提取试剂盒为动物组织总 RNA 提取试剂盒;反转录试剂盒为 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂;定量 PCR(SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版 SYBR Green)试剂盒均购自天根生化科技有限公司;引物由博迈德生物技术有限公司合成;Masson 染液购自南京建成生物工程研究所;ABI 实时荧光定量 PCR 仪 StepOnePlus 购自美国 Applied Biosystems 公司。

收稿日期:2018-08-07

基金项目:内蒙古自然科学基金资助项目(2016MS(LH)0306);内蒙古自治区大学生创业实践资助项目(201710127008);包头医学院花蕾计划资助项目(2017BYJJ-HL-08)。

第一作者简介:孙旭(1996-),男,在读学士,从事慢性肾病研究。E-mail:754641726@qq.com。

通讯作者:丁海麦(1975-),男,硕士,副教授,从事慢性肾病研究。E-mail:dinghaimai@126.com。

1.2 方法

1.2.1 分组、动物造模及给药 分组:将 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、UUO 模型(UUO)组、UUO+5 mg·kg⁻¹褪黑素组、UUO+10 mg·kg⁻¹褪黑素组、UUO+15 mg·kg⁻¹褪黑素组,每组 9 只。

造模:术前器械消毒,腹腔内注射 1%戊巴比妥钠麻醉,将大鼠俯卧位固定于鼠板,腹部正中竖切口逐层进腹,充分暴露右侧肾脏,用小弯镊轻轻剥离肾下极部分包膜及肾蒂处包膜,分离出输尿管,UUO 组和褪黑素处理组用 4-0 丝线在近肾下极处结扎右侧输尿管,逐层缝合腹壁各层及腹部皮肤,消毒,盖无菌纱布。假手术组大鼠仅做分离,不结扎右侧输尿管,其余所有处理同上。

给药:褪黑素溶于生理盐水,褪黑素处理组均于手术当晚开始分别按 5、10、15 mg·kg⁻¹灌胃药,每 24 h 灌胃 1 次,持续 14 d。Sham 组和 UUO 组每天灌胃等剂量生理盐水。所有动物均采用标准颗粒饲料喂养,自由进食、饮水。

1.2.2 标本收集 于第 14 天大鼠,摘除右肾,小心去处肾包膜,放出积水。冰冷生理盐水冲洗后,一半放入超低温冰箱中保存以提取 RNA 做实时荧光定量 PCR,另一半放在 4%多聚甲醛中固定,常规脱水石蜡包埋,待做 Masson 染色。

1.2.3 肾脏组织病理分析 按照试剂盒说明 Masson 染色,中性树胶封片,显微镜下观察肾脏组织病理变化。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测应用 DNAMAN 软件设计 TGF-β₁/Smads 通路分子 TGF-β₁、Smad₃、Smad₇ 和 Collagen Type I 特异性引物,引物序列如表 1 所示,以 β-actin 作为内参对照。从超低温冰箱中取出小鼠肾脏组织液氮研磨,采用 Trizol 试剂提取肾组织 RNA,并于 260/280 nm 测定吸光度(A)值,分析 RNA 的纯度和浓度,按照试剂盒说明合成 cDNA 第一条链,用 SuperReal 荧光定量预混试剂进行实时荧光定量 PCR。PCR 程序为:95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s, 52 ℃ 15 s,72 ℃45 s,40 个循环。同时采用溶解曲线分析以评价 PCR 结果的可靠性。以 β-actin 为内参将得到的结果用 ΔΔCt 法分析。采用相对表达量=2^{-ΔΔCt}表示待测基因相对表达水平。

2 结果与分析

各组大鼠术后 14 d 眶静脉取静脉血 1 次,测血肌酐、尿素氮。褪黑素处理组、UUO 组与 Sham 组相比,无统计学意义,可能独肾可以代偿

肾功能。

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

Primers	Sequence(5'-3')
TGF-β ₁	Forward:tca gac att cgg gaa gca g
	Reverse:aga cag cca ctca ggc gta t
Smad ₃	Forward:ttg aca agg tcc tca ccc a
	Reverse:tgg cat ctt ctg tgg ttt ca
Smad ₇	Forward:ggc tgt gtt gct gtg aat c
	Reverse:gct cca gaa gaa gtt ggg a
Collagen type I	Forward:ggg aca cag agg ttt cag tg
	Reverse:gac agc acc atc gtt acc ac
β-actin	Forward:cgt tga cat ccg taa aga cc
	Reverse:gata gag cca cca atc cac a

2.1 各组大鼠第 14 天肾脏病理组织、形态学改变

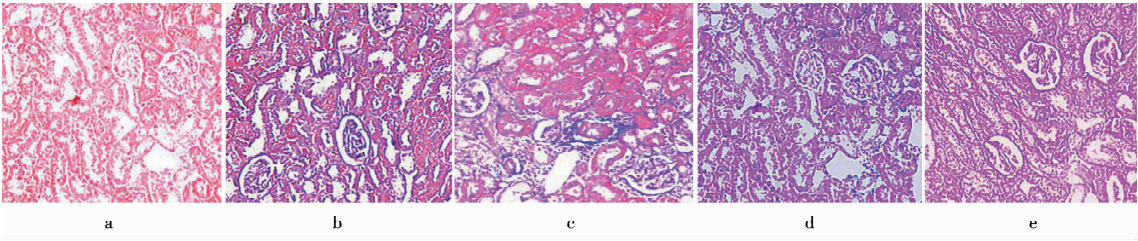
2.1.1 形态观察 Sham 组小鼠肾脏外观正常。UUO 组、UUO+5 mg·kg⁻¹组、UUO+10 mg·kg⁻¹组、UUO+15 mg·kg⁻¹组大鼠肾脏体积不同程度增大,可见肾积水,肾实质变薄,肾盂扩张,肾乳头萎缩。

2.1.2 病理结果 Masson 染色结果表明,Sham 组大鼠肾组织结构均正常,小管排列紧密、整齐,小管基底膜连续,间质区无明显胶原沉积;UUO 组肾脏可见部分肾小管上皮细胞空泡变性,部分管腔扩张,萎缩坏死,可见肾间质水肿成纤维细胞增生和肾间质纤维化。褪黑素处理组肾小管上皮细胞空泡变性,管腔扩张,萎缩坏死和间质纤维化范围均较 UUO 组减轻,随褪黑素浓度增加间质纤维化程度越轻。

2.2 褪黑素对各组大鼠肾组织 TGF-β₁ 表达影响 与 Sham 组相比,UUO 组 TGF-β₁ mRNA 表达显著升高(P<0.01);褪黑素处理组与 UUO 组比较,TGF-β₁ mRNA 表达均较 UUO 减弱,随着褪黑素浓度增加减弱趋势越明显(P<0.05,部分 P<0.01)(图 2),说明褪黑素能抑制肾组织 TGF-β₁/Smad₃ 信号分子 TGF-β₁ 的过度表达。

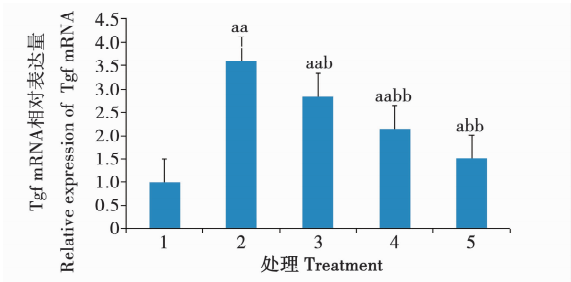
2.3 褪黑素对各组大鼠肾组织 Smad₃ 表达影响

与 Sham 组相比,UUO 组 Smad₃ mRNA 表达显著升高(P<0.01);褪黑素处理组与 UUO 组比较,Smad₃ mRNA 表达均较 UUO 减弱,随着褪黑素浓度增加减弱趋势越明显(P<0.05,部分 P<0.01)(图 3),说明褪黑素能抑制肾组织 TGF-β₁/Smad₃ 通路中间分子 Smad₃ 过度表达。



a:Sham;b:UUO;c:UUO+5 mg·kg⁻¹褪黑素;d:UUO+10 mg·kg⁻¹褪黑素;e:UUO+15 mg·kg⁻¹褪黑素
a:Sham;b: UUO;c:UUO+5 mg·kg⁻¹MEL;d:UUO+10 mg·kg⁻¹MEL;e:UUO+15 mg·kg⁻¹MEL

图 1 各组肾组织 Masson 染色病理改变(×10)
Fig. 1 Renal tubular damage of UUO rats(×10)



1:Sham 组;2:UUO 组;3:UUO+5 mg·kg⁻¹褪黑素组;4:UUO+10 mg·kg⁻¹褪黑素组;5:UUO+15 mg·kg⁻¹褪黑素;与正常对照组比:a 为 $P<0.05$, aa 为 $P<0.01$;与 UUO 组比:b 为 $P<0.05$, bb 为 $P<0.01$ 。下同
1:Sham;2:UUO;3:UUO+5 mg·kg⁻¹MEL;4:UUO+10 mg·kg⁻¹MEL;5:UUO+15 mg·kg⁻¹MEL. a: $P<0.05$, aa: $P<0.01$, different groups compared to the Sham; b: $P<0.05$, bb: $P<0.01$, different groups compared to the UUO; The same below

图 2 手术后 14 d 肾组织 TGF-β₁ 表达比较
Fig. 2 Comparison of TGF-β₁ expression in renal tissue 14 days after operation

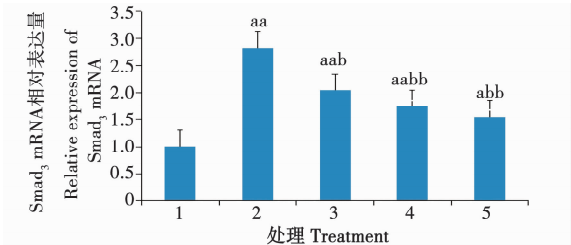


图 3 手术后 14 d 肾组织 Smad₃ 表达比较
Fig. 3 Comparison of Smad₃ expression in renal tissue 14 days after operation

2. 4 褪黑素对各组大鼠肾组织 Smad₇ 表达影响

与 Sham 组相比,UUO 组 Smad₇ mRNA 表达显著降低($P<0.01$);褪黑素处理组与 UUO 组比较,Smad₇mRNA 表达均较 UUO 升高,随着褪黑素浓度增加增加趋势越明显($P<0.05$)(图 4)。说明褪黑素能提升肾组织 TGF-β₁/Smad₃ 通

路负调节因子 Smad₇ 表达。

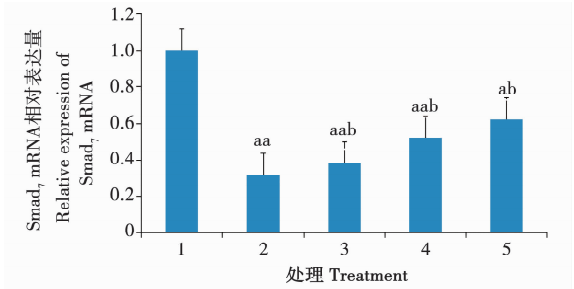


图 4 手术后 14 d 肾组织 Smad₇ 表达比较
Fig. 4 Comparison of Smad₇ expression in renal tissue 14 days after operation

2. 5 褪黑素对各组大鼠肾组织 Collagen Type I 表达影响

Collagen Type I 表达水平与胶原蛋白呈正相关。与 Sham 组相比,UUO 组 Collagen Type I mRNA 表达显著升高($P<0.01$);褪黑素处理组与 UUO 组比较,Collagen Type I mRNA 表达均较 UUO 降低,随着褪黑素浓度增加减弱趋势越明显($P<0.05$,部分 $P<0.01$)(图 5)。说明治褪黑素能抑制肾组织 Collagen Type I 过度表达。

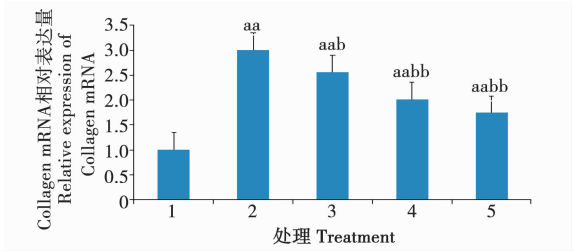


图 5 手术后 14 d 肾组织 Collagen Type I 表达比较
Fig. 5 Comparison of Collagen Type I expression in renal tissue 14 days after operation

3 结论与讨论

在绝大多数慢性肾病患者中,引起器官功能不全的主要原因是损伤组织不可逆的疤痕,肾小球内的这一过程表现为继发性肾小球硬化,而肾

小管间隙则表现出纤维化,共同特征是细胞外基质蛋白的合成^[7]。TGF- β_1 调节细胞增殖、分化、迁移和凋亡等多种细胞过程^[8]。TGF- β_1 被公认为是纤维化疾病中的关键促纤维化介质,合成后 TGF- β_1 以无活性前体形式存在靶细胞,当暴露于多种类型的刺激如 ROS、纤溶酶、缺氧和炎症条件下,TGF- β_1 以活性形式释放,与 T β RII(II 型 TGF- β 受体)结合,并募集 T β RI(I 型 TGF- β 受体)使下游受体相关的 Smads(R-Smads)如 Smad₂ 和 Smad₃ 磷酸化。随后,磷酸化的 Smad₂ 和 Smad₃ 与 Smad₄ 形成寡聚复合物进入细胞核,Smad₃ 直接结合到靶基因启动子区触发胶原蛋白产生,降低 MMP-1 活性,抑制 ECM 的降解,促进肾纤维化。而 Smad₇ 与 R-Smads 竞争结合激活的受体,以发挥其对 TGF- β /Smad 信号传导的负调控作用^[9]。单侧输尿管梗阻导致肾脏间质纤维化模型的特点是进行性的小管萎缩和肾间质纤维化,肾脏间质纤维化即肾组织瘢痕形成后,病理改变具有固定不移、经久不愈^[10]。

定量 PCR 结果表明,与 Sham 相比,UUO 组 TGF- β_1 、Smad₃、Collagen Type I mRNA 表达均升高,Smad₇ 表达降低。与 UUO 组相比褪黑素低剂量组 TGF- β_1 、Smad₃、Collagen Type I mRNA 表达稍有下降,Smad₇ mRNA 表达稍有回升,随着褪黑素浓度升高这种变化趋势越来越明显。分析原因 UUO 模型能激活 TGF- β_1 /Smads 信号通路,表现为 TGF- β_1 、Smad₃ 表达增加,Smad₇ 表

达下降;褪黑素干预后 TGF- β_1 、Smad₃ 表达较 UUO 组显著降低,Smad₇ 较 UUO 组显著升高,由此推测褪黑素可能通过下调 TGF- β_1 、Smad₃ 及上调 Smad₇ 来抑制 TGF- β_1 /Smads 信号通路,从而减少肾间质胶原蛋白沉积,改善肾间质纤维化作用,并与褪黑素剂量有相关性。

参考文献:

- [1] 苏丽娜,覃远汉,周添标,等.转化生长因子- β_1 /Smad₃ 信号通路在肾间质纤维化大鼠肾脏组织中的表达和作用[J].实用儿科临床杂志,2011(5):325-328.
- [2] 周丹,沈延春,王芳,等.褪黑素对慢性肾衰竭大鼠肾脏的保护作用[J].医药导报,2009(12):1535-1539.
- [3] 邹经纬,凌月福.褪黑素的研究进展及对肾脏的保护作用[J].中国医药科学,2013(5):51-53,73.
- [4] 武贵群,高翔,梅长林. TGF- β /Smads 通路 & 肾脏纤维化研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2012(5):459-461.
- [5] Kennaway D J. Are the proposed benefits of melatonin-rich foods too hard to swallow? [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2017,57(5):958-962.
- [6] Choi H S,Kang J W. Melatonin attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of necroptosis[J]. Translational Research,2015,166(3):292-303.
- [7] Bae J S,Kim S M,Lee H. The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets [J]. Oncotarget,2017,8(9):16084-16098.
- [8] Dwivedi S K, McMeekin S D, Slaughter K. Role of TGF- β signaling in uterine carcinosarcoma[J]. Bhattacharya Roncotarget,2015, 6(16):14646-14655.
- [9] Agnieszka L,Mateusz S,Alicja J,et al. TGF- β_1 /Smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation[J]. Mediators of Inflammation,2016:8319283.
- [10] 程小红,于小勇,毛加荣. IgA 肾病的病理改变与中医微观辨证 [J]. 中国中西医结合肾病杂志,2014, 15(2): 185-186.

Intervention Study of Melatonin on TGF- β_1 /Smads Signaling Pathway in Rat Fibrosis

SUN Xu¹,ZHANG Zhe¹,SUN Chen¹,ZHANG Hui¹,WEN Ju-ming¹,DING Hai-mai²

(1. Wulanchabu Clinical College, Baotou Medical College, Wulanchabu 012000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

Abstract: Melatonin is a pleiotropic neurohormone secreted mainly by the pineal gland. It has a variety of biological functions including anti-oxidative stress, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-tumor properties, as well as regulation of circadian rhythm. In order to explore a new way to prevent renal interstitial fibrosis. In this study we observed the effect of melatonin on the unilateral ureteral obstruction (UUO) constructing the renal fibrosis model. SD rats were randomly divided into sham operation group, UUO model (UUO) group, UUO + 5 mg·kg⁻¹ melatonin group, UUO + 10 mg·kg⁻¹ melatonin group, UUO + 15 mg·kg⁻¹ melatonin group, each group 6. They were administered by intragastric administration on the evening of the operation, once every 24 hours. The rats were sacrificed for 14 days. Serum creatinine and urea nitrogen were detected by serum. Masson staining was used to observe the pathological results of kidney tissue. The expressions of TGF- β_1 , Smad₃, Smad₇ and Collagen Type I mRNA were detected by real-time quantitative PCR. The results showed that melatonin reduced the pathological damage of renal fibrosis, decreased the expression of TGF- β_1 , Smad₃ and Collagen Type I mRNA, and increased the expression of Smad₇ mRNA ($P < 0.05$, part $P < 0.01$) to 15 mg·kg⁻¹ improves best. Melatonin can down-regulate TGF- β_1 , Smad₃, Collagen Type I and up-regulate Smad₇ to inhibit TGF- β_1 /Smads signaling pathway, thereby exerting renal interstitial fibrosis.

Keywords: melatonin; renal interstitial fibrosis; TGF- β_1 ; Smad₃; Smad₇