

槲皮素预防先天性肾积水的实验研究

刘明学¹ 刘 靖² 刘 星³ 魏光辉³

【摘要】 目的 研究槲皮素对先天性肾积水的预防作用。**方法** 在第 12 个妊娠日 (gestational day, GD), 将 C57BL/6J 孕鼠随机分为四组: 对照组以玉米油灌胃, TCDD 组以 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英 (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, TCDD, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 灌胃, 槲皮素组以槲皮素 (100 mg/kg) 灌胃, TCDD + 槲皮素组以槲皮素 (100 mg/kg) 及 TCDD (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 灌胃。于 GD18, 检查胎鼠畸形发生情况, 并留取胎鼠泌尿系统做组织学观察及免疫组化检测。**结果** 对照组及槲皮素组胎鼠无畸形发生。TCDD 组胎鼠双侧肾盂及输尿管上段积水的发生率为 100% (肾积水 3 级占 84.1%, 4 级占 15.9%), TCDD + 槲皮素组肾积水的发生率为 13.4% (均为 3 级), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组织化学检测结果显示, 对照组与槲皮素组胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白均呈阴性表达; TCDD 组及 TCDD + 槲皮素组存在肾积水的胎鼠输尿管黏膜上皮呈阳性表达。TCDD 组胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白阳性表达率 (100%) 高于 TCDD + 槲皮素组 (13.4%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 槲皮素能有效降低 TCDD 所致胎鼠肾积水的发生率, 其对 TCDD 所致胎鼠肾积水的预防作用与抑制胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白的表达有关。

【关键词】 槲皮素; 肾盂积水/先天性; 动物实验

Study on the effect of quercetin prevent with congenital hydronephrosis. LIU Ming-xue¹, LIU Jing², LIU Xing³, et al. 1, Department of Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, 361003, China. 2, Medical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, 361003, China. 3, Department of Urology, The Children's Hospital of Chongqing University Medicine Sciences, Chongqing, 400014, China.

【Abstract】 Objective To research the effect of quercetin prevent with congenital hydronephrosis induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD). **Methods** Pregnant C57BL/6J mice was divided into four groups randomly on gestational day (GD) 12. Corn oil was given pregnant mice with intragastric administration in control group, TCDD (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was given in TCDD group, quercetin (100 mg/kg) was given in quercetin group, TCDD (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and quercetin (100 mg/kg) was given in TCDD + quercetin group. Teratogeny of fetus was distinguished, fetal urinary system was gain for histology examine and immunohistochemistry analysis, on GD18. **Results** All fetus were normal and no malformation was found in control group and quercetin group on GD18. Incidence rate of bilateral hydronephrosis and hydroureter was 100% (grade 3 hydronephrosis was 84.1%, grade 4 hydronephrosis was 15.9%) in TCDD group fetus on GD18. Incidence rate of bilateral hydronephrosis and hydroureter was 13.4% (all were grade 3) in TCDD + quercetin group fetus on GD18. The difference of incidence rate between TCDD group and TCDD + quercetin group was significant ($P < 0.05$). Prx 1 protein expression in epithelium of mucous membrane of fetal ureter was negative in control group and quercetin group, was positive in TCDD group, was positive in TCDD + quercetin group fetus with hydronephrosis on GD18. The positive rate for Prx 1 protein expression in epithelium of mucous membrane of fetal ureter was 100% in TCDD group, which is greater than TCDD + quercetin group (13.4%) ($P < 0.05$). **Conclusion** Incidence rate congenital hydronephrosis induced by TCDD in C57BL/6J fetal mice may be cut down effectually

by quercetin. Effect of quercetin prevent with congenital hydronephrosis induced by TCDD in C57BL/6J fetal mice is related with that Prx 1 protein expression is inhibited in epithelium of mucous membrane of fetal ureter.

【Key words】 Quercetin; Hydronephrosis/CN; Animal Experimentation

先天性肾积水是小儿泌尿外科常见病,其中绝大部分是由肾盂输尿管连接处梗阻(ureteropelvic junction obstruction, UPJO)所致。UPJO 的病因尚不清楚,近年来其发病率不断上升,可能与工业化过程中持久性环境污染物二噁英排放增加有关。2,3,7,8-四氯二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, TCDD)是毒性最强、目前研究最多的二噁英,已有研究表明,在多种动物的胚胎期和哺乳期,低剂量 TCDD 即可诱发肾积水^[1]。作者前期的研究也证实,TCDD 能诱导小鼠发生肾积水,其病理学表现与人类 UPJO 相似^[2]。TCDD 的各种生物学效应主要是通过激活芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)实现^[3]。植物中含量最高的黄酮类化合物——槲皮素,是 AhR 的天然配体,能与 TCDD 竞争 AhR,且几乎没有毒副作用,可作为对抗 TCDD 的较好选择^[4]。作者利用槲皮素对 TCDD 导致的先天性肾积水进行干预,以期 UPJO 寻求一种安全有效的预防方法。

材料与方法

一、实验动物与主要试剂

采用 10~12 周龄、体重 20~25 g 的清洁级 C57BL/6J 小鼠(购自重庆医科大学实验动物中心)。Prx 1 羊抗鼠多克隆抗体(购自美国 Santa Cruz 公司);TCDD,玉米油,槲皮素(购自美国 Sigma-Aldrich 公司);DAB 显色试剂盒(购自北京中山生物技术公司)

二、实验动物分组及处理

将小鼠饲养于清洁级笼具,环境温度为 23℃~25℃,湿度(55±5)%,室内光照为 12 h/12 h 明暗交替,自由摄食、饮水。适应新环境 1 周,雌雄鼠各一只于黄昏时合笼交配,第 2 日晨观察雌鼠外阴,见阴栓当日记为第 0 个妊娠日(gestational day, GD)。每只孕鼠单独饲养,自由摄食、饮水。将孕鼠随机分成对照组、TCDD 组、槲皮素组、TCDD + 槲皮素组,每组各 10 只。在第 12 个妊娠日(gestational day, GD),对照组孕鼠以玉米油(12.5 mL/kg)灌胃;TCDD 组孕鼠以 TCDD(25 μg/kg,用玉米油配制成 2 μg/mL)灌胃;槲皮素组以槲皮素(100 mg/kg,

用蒸馏水配制成 8 mg/mL)灌胃;TCDD + 槲皮素组以槲皮素(100 mg/kg)灌胃,1 h 后以 TCDD(25 μg/kg)灌胃。每日观察孕鼠外观、摄食、饮水及活动情况,有无流产及早产,并称量体重。于 GD18 称重后脱颈处死孕鼠,统计胎鼠数及存活情况,有无死胎及吸收胎,对每只胎鼠称重后断头处死,于显微镜下解剖胎鼠,观察头颅、肢体及主要脏器有无畸形,并留取胎鼠泌尿系统做组织学观察及免疫组化检测。

由于 TCDD 是剧毒化学品和一级致癌物,所有参加实验的人员均学习安全操作规程,并严格按照安全操作规程进行实验,在进行危险操作时穿戴防护衣、手套和面具;污染材料单独收集,按有害废物处置,接受 TCDD 灌胃的孕鼠单独饲养,实验组孕鼠及胎鼠的尸体按污染生物材料处置。

三、组织形态学观察

将留取的孕鼠及胎鼠各脏器标本用 4% 多聚甲醛固定 6 h,常规石蜡包埋、组织切片,苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色。具体步骤如下:切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡至水,苏木精染液染色 5~15 min,0.5% 盐酸酒精分色 30 s,流水冲洗 15~30 min,0.1% 伊红染液染色 2 min,依次经 70%、85%、95%、100% 酒精脱水,各级为 2~3 min,二甲苯透明 2 次,共约 10 min,中性树胶封片,光学显微镜观察。

根据肾积水程度将胎鼠肾积水分五级:0 级,肾盂完全被肾乳头填充;1 级,肾盂轻度扩张;2 级,肾乳头缩小,肾盂显著扩张;3 级,肾乳头非常小,肾组织被压缩;4 级,肾乳头消失,肾组织菲薄^[5]。

四、免疫组织化学检测

将石蜡切片放入 60℃ 烤箱加热 20 min,纯二甲苯脱蜡 2 次,梯度酒精水化至水,PBS 浸泡 5 min×2 次。滴加 3% 甲醇-H₂O₂ 封闭,室温 10 min,消除内源性过氧化物酶,PBS 浸泡 5 min×3 次。0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6)浸泡,微波炉加热,室温冷却,PBS 洗 2~3 次,各 5 min,5% 正常山羊血清室温封闭 20 min,甩去多余液体。加入 1 μg/mL 稀释的羊抗鼠 peroxiredoxin 1(Prx 1)多克隆抗体,用 PBS 代替一抗作为阴性对照,湿盒内 4℃ 冰箱过夜。37℃ 复温 45 min,PBS 浸泡,5 min×3 次,滴加二抗,室温静置 1 h。PBS 浸泡,DAB 显色。自来水冲洗

10 min,苏木精复染 15 ~ 30 s,1% 盐酸酒精分化。常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片保存。显微镜下观察。结果判断:以细胞浆呈棕色颗粒状者为阳性细胞,以阳性细胞数占同类细胞总数的 5% 以上为阳性。

五、统计学处理

以 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计数资料采用 Wilcoxon 秩和检验,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 灌胃后孕鼠每日体重($g, \bar{x} \pm s$)

分组	GD12	GD13	GD14	GD15	GD16	GD17	GD18
对照组	25.55 ± 0.58	26.64 ± 0.58	27.78 ± 0.79	28.99 ± 0.85	30.24 ± 0.93	31.41 ± 0.88	32.22 ± 0.92
TCDD 组	25.29 ± 0.48	26.48 ± 0.55	27.64 ± 0.64	28.86 ± 0.70	30.05 ± 0.76	31.21 ± 0.77	32.12 ± 0.81
槲皮素组	25.45 ± 0.50	26.44 ± 0.58	27.69 ± 0.61	28.96 ± 0.61	30.1 ± 0.62	31.28 ± 0.70	32.12 ± 0.83
TCDD + 槲皮素组	25.45 ± 0.52	26.59 ± 0.54	27.66 ± 0.76	28.87 ± 0.80	30.1 ± 0.82	31.19 ± 0.84	32.12 ± 0.96

注:各组间每日体重比较, $P > 0.05$ 。

二、各处理因素对胎鼠的影响

各组胎鼠体重差别无统计学意义($P > 0.05$,表 2),均为活胎,无死胎及吸收胎。对照组胎鼠双侧肾脏、输尿管及膀胱均正常,其余各脏器也均正常。TCDD 组全部胎鼠双侧肾盂及上段输尿管积水扩张明显(100%),输尿管中段扭曲、折叠,下段输尿管及膀胱外观正常,其余各脏器均正常。槲皮素组胎鼠双侧肾脏、输尿管及膀胱均正常,其余各脏器也均正常。TCDD + 槲皮素组,58 只胎鼠双侧肾脏、输尿管及膀胱均正常,9 只胎鼠双侧肾盂及上段输尿管积水扩张明显(13.4%),输尿管中段扭曲、折叠,下段输尿管及膀胱外观正常,其余各脏器均无明显畸形。TCDD 组胎鼠肾积水的发生率高于其余各组($P < 0.05$)。GD18,各组胎鼠泌尿系统解剖学表现见图 1。

表 2 妊娠第 18 天胎鼠体重($g, \bar{x} \pm s$)

组别	体重
对照组	0.85 ± 0.03
TCDD 组	0.86 ± 0.04
槲皮素组	0.86 ± 0.04
TCDD + 槲皮素组	0.86 ± 0.03

注:各组间两两比较, $P > 0.05$

三、胎鼠泌尿系统组织学表现

HE 染色切片结果显示,对照组、槲皮素组的肾脏、输尿管组织学表现均正常。TCDD 组双侧肾积水发生率为 100%,胎鼠肾间质纤维化;其中 58 只

结 果

一、各处理因素对孕鼠的影响

与对照组比较,各处理组孕鼠外观无异常,皮毛色泽光亮,无脱毛,摄食、饮水及活动正常,无流产及早产;各组产仔数比较无统计学意义($P > 0.05$),对照组胎鼠 71 只,TCDD 组 69 只,槲皮素组 69 只,TCDD + 槲皮素组 67 只;每日体重增长与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

胎鼠 116 侧肾脏为 3 级肾积水(84.1%);11 只胎鼠 22 侧肾脏为 4 级肾积水(15.9%);输尿管平滑肌层未见明显异常,中下段输尿管黏膜移行上皮增生,管腔变窄。TCDD + 槲皮素组有肾积水表现的 9 只胎鼠中,18 侧肾脏均为 3 级肾积水(13.4%),输尿管平滑肌层未见明显异常,中下段输尿管黏膜移行上皮增生,管腔变窄;其余 58 只胎鼠双侧肾脏、输尿管均正常。TCDD 组胎鼠肾积水的发生率高于其余各组($P < 0.05$)。各组胎鼠膀胱的组织学表现均正常。GD18,各组胎鼠的肾脏及输尿管组织学表现见图 2、图 3;各组胎鼠肾积水发生率见表 3。

表 3 胎鼠畸形的发生情况(只,%)

组别	胎鼠数▲ (只)	肾积水胎鼠数 (只)	肾积水发生率 (%)
对照组	71	0	0
TCDD 组	69	69 *	100 *
槲皮素组	69	0	0
TCDD + 槲皮素组	67	9 *	13.4 *

注: * 与其余各组比较, $P < 0.01$;▲各组间两两比较, $P > 0.05$

四、免疫组织化学检测结果

GD18,对照组与槲皮素组胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白均呈阴性表达;TCDD 组均呈阳性表达(100%);TCDD + 槲皮素组有肾积水表现的 9 只胎鼠,18 条输尿管的黏膜上皮 Prx 1 蛋白呈阳性表达(13.4%),其余为阴性表达(表 4)。TCDD 组胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白阳性表达率高于其余各组($P < 0.05$)。各组免疫组化染色见图 4。

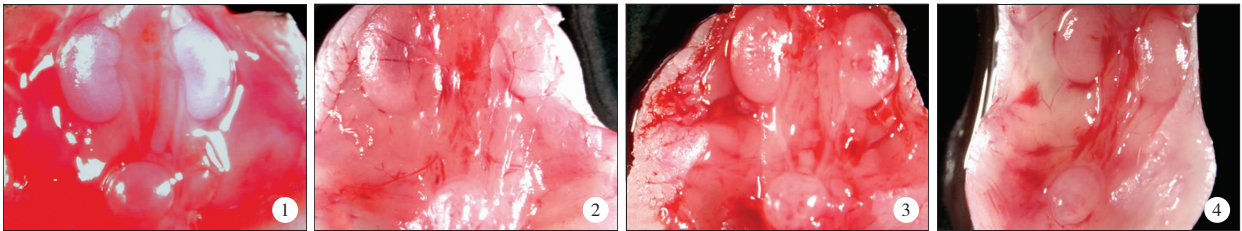


图 1 GD18,各组胎鼠的泌尿系统(HE×10), ①对照组; ②TCDD 组; ③槲皮素组; ④ TCDD+ 槲皮素组

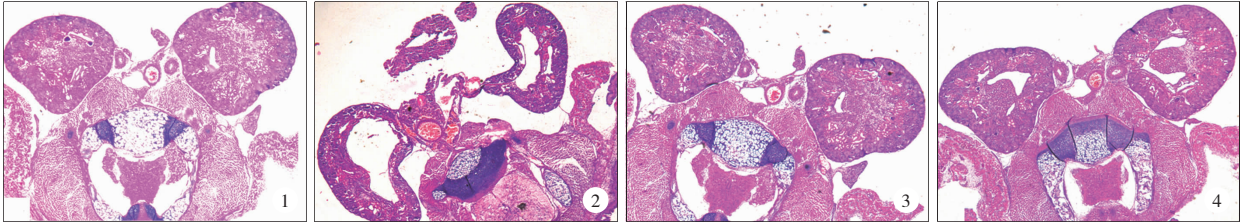


图 2 GD18,各组胎鼠的肾脏组织学表现(HE×40), ①对照组; ②TCDD 组; ③槲皮素组; ④TCDD + 槲皮素组

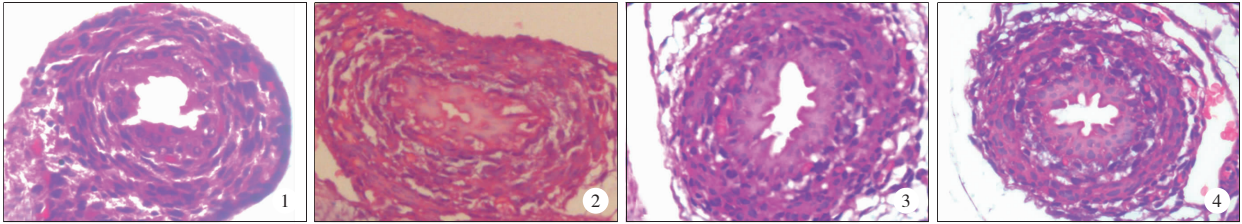


图 3 GD18,各组胎鼠的输尿管组织学表现(HE×400), ①对照组; ②TCDD 组; ③槲皮素组; ④TCDD + 槲皮素组

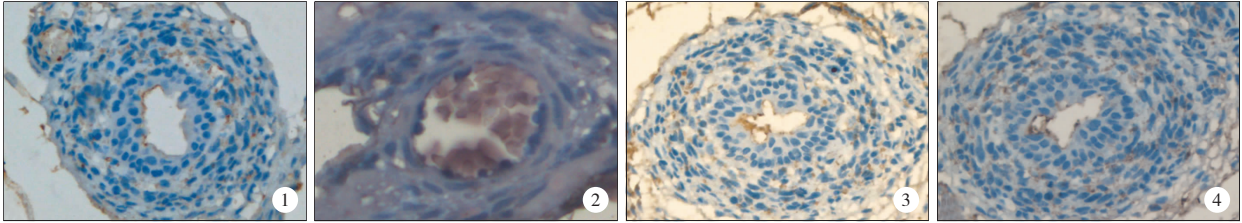


图 4 GD18,各组胎鼠的输尿管 Prx 1 蛋白表达情况(SP×400), ①对照组; ②TCDD 组; ③槲皮素组; ④TCDD + 槲皮素组

表 4 Prx 1 蛋白在胎鼠输尿管上皮的表达情况

组别	胎鼠数 (只)	黏膜上皮 Prx 1 蛋白阳性 表达的输尿管数(条)	阳性率 (%)
对照组	71	0	0
TCDD 组	69	138 *	100 *
槲皮素组	69	0 **	0 **
TCDD + 槲皮素组	67	18 *	13.4 *

注: * 与各组比较, $P < 0.01$; ** 与 TCDD 组及 TCDD + 槲皮素组比较, $P < 0.01$, 与对照组比较, $P > 0.05$ 。

讨 论

槲皮素是一种天然黄酮类化合物,化学名为 3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮,多以糖苷的形式存在于植物的花、叶、果实中,如芦丁(芸香苷)、槲皮苷、金丝桃苷等。许多植物,包括中草药如槐米、红枣、罗布麻、桑叶、银杏叶、三七、金荞麦等均含此成分,槐米

花中含量高达 4%。槲皮素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和清除自由基等多种生物活性^[6]。

多种黄酮类化合物与 TCDD 一样,都是依赖 AhR 而发挥其各自的生物学作用。两者的受体后机制一样:芳香烃受体复合物与芳香烃受体核转位子结合形成异型二聚体进入细胞核内,与特异的 DNA 序列——二噁英反应元件结合,激活启动 P450 基因超家族,再启动下游靶基因的转录,诱导产生多种生物学效应^[7]。为何黄酮类化合物通过 AhR 产生有益的生物学作用,而 TCDD 产生有害的作用?其原因目前尚不清楚,估计与启动不同的下游靶基因有关。槲皮素与 TCDD 的化学结构都具有多环芳香烃的特征,决定了它们都能与 AhR 紧密结合,且槲皮素可优先与 AhR 结合,但需要高于 TCDD 数千倍的浓度才能与之竞争^[7]。此外,槲皮素还能抑制被 TCDD 激活的 AhR^[8]。

基于黄酮类化合物与 AhR 的密切关系,已有学者将某些黄酮类化合物用于预防 TCDD 所致肾积水。Jang JY 等^[5]对 α -萘黄酮对抗 TCDD 的致畸效应进行了研究,在 C57BL/6J 小鼠妊娠第 12 天,给予 TCDD 灌胃后,一次性给予孕鼠 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 α -萘黄酮灌胃;或于妊娠第 8~13 天,每天给予孕鼠 5 mg/kg 灌胃,在妊娠第 12 天,给予 TCDD 灌胃。妊娠第 18 天,连续给予 α -萘黄酮组胎鼠肾积水和输尿管积水程度明显减轻,肾积水发生率为 100%。利用另一种黄酮类化合物白藜芦醇进行类似实验,也得到同样的结果^[9]。在这两项研究中,胎鼠肾积水的发生率无降低,估计与给予 α -萘黄酮或白藜芦醇剂量过低有关。因为黄酮类化合物在体内半衰期较短^[10];而二噁英在体内的半衰期长达数月甚至数年,低剂量给药及较短的半衰期,使不能维持足够长时间的体内有效浓度,使对抗 TCDD 的作用有限。

作者于 C57BL/6J 小鼠妊娠第 12 天,TCDD 灌胃前 1 h,一次性给予孕鼠较大剂量槲皮素(100 mg/kg ,按照摩尔数计算,剂量接近 TCDD 的 4 000 倍),使 TCDD 所致胎鼠肾积水的发生率由 100% 降至 13.4%。槲皮素存在于多种植物中,包括小鼠在内的杂食性动物每天所摄取食物中即含有一定量的槲皮素,其毒副作用轻微,食用安全。

HE 染色及免疫组化结果表明,槲皮素减轻了 TCDD 导致的胎鼠输尿管黏膜上皮增生,降低了胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白的表达。Prx 1 蛋白与细胞增殖和分化密切相关,被称为增殖相关蛋白,可通过 c-Abl 基因和 c-Myc 基因调节细胞周期,而达到促进细胞增殖的作用^[11]。此外,Prx 1 蛋白促进细胞增殖的作用还与减少细胞凋亡有关。在前期研究中,作者已经证实 TCDD 导致小鼠先天性肾积水是由于胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白表达增强,刺激输尿管黏膜上皮增生,引起输尿管管腔狭窄所致^[5]。槲皮素通过抑制 Prx 1 蛋白表达,减少了其对胎鼠输尿管黏膜上皮的增生刺激作用,从而有效降低了胎鼠肾积水的发生率。与 Jang JY 等^[8,18]的研究相比,槲皮素能有效降低 TCDD 所致胎鼠肾积水的发生率,除与其用量较大有关外,另一方面是由于槲皮素更具有针对性,即它抑制了 TCDD 导致胎鼠肾积水的靶蛋白——Prx 1 蛋白。

本实验利用槲皮素对 TCDD 导致的先天性肾积水进行干预,发现槲皮素能预防 TCDD 诱导的小鼠先天性肾积水,且没有明显毒副作用,这对预防人类 UPJO 有一定启发意义。槲皮素对肾积水的预防作

用与其降低胎鼠输尿管黏膜上皮 Prx 1 蛋白的表达,减轻 TCDD 所致胎鼠输尿管黏膜上皮增生有关。

参考文献

- 1 Nishimura N, Matsumura F, Vogel CF, et al. Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 231(3):374-383.
- 2 刘明学,魏光辉,刘靖,等. 2,3,7,8-TCDD 所致胎鼠肾积水发生机制的研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2009, 30(4):253-256.
- 3 Benson JM, Shepherd DM. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease[J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 120(1), 68-78.
- 4 Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially[J]. *Biochem J*, 1999, 340(Pt 3):715-722.
- 5 Jang JY, Shin S, Choi BI, et al. Antiteratogenic effects of alpha-naphthoflavone on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposed mice in utero[J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(3-4):303-309.
- 6 Bournival J, Francoeur MA, Renaud J, et al. Quercetin and Sesamin Protect Neuronal PC12 Cells from High-Glucose-Induced Oxidation, Nitrosative Stress, and Apoptosis[J]. *Rejuvenation Res*, 2012, 15(3):322-333.
- 7 Mandal PK. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology[J]. *J Comp Physiol [B]*, 2005, 175(4):221-230.
- 8 Amakura Y, Tsutsumi T, Sasaki K, et al. Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(18):3117-3130.
- 9 Jang JY, Park D, Shin S, et al. Antiteratogenic effect of resveratrol in mice exposed in utero to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(1-3):280-283.
- 10 Legette L, Ma L, Reed RL, et al. Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(3):466-474.
- 11 Mu ZM, Yin XY, Prochownik EV. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(45):43175-43184.