

大黄泄浊方调控 ROS/TXNIP/NLRP3 通路对 5/6 肾切除大鼠 肾间质纤维化的影响

曹雯萱^{1,2}, 辛鑫^{1,2}, 檀森³, 高飞⁴, 杨凤文², 陈素枝², 任美芳², 檀金川^{2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011;

3. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050000; 4. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的:通过观察大黄泄浊方对 5/6 肾切除大鼠肾脏病理变化,肾组织活性氧(ROS)/硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)/NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)通路表达的变化,研究其保护肾功能,延缓肾间质纤维化的作用机制及可能性。方法:90 只健康 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、大黄泄浊方低、中、高剂量(6.825、13.65、27.30 g·kg⁻¹)组和尿毒清颗粒(2.60 g·kg⁻¹)组。除假手术组外其余 5 组均采用 5/6 肾切除术复制 CRF 大鼠模型。造模成功后,各给药组分别给予相应剂量的药物混悬液灌胃,每日 1 次,连续 8 周。给药结束后,检测大鼠血清中肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)水平和 24 h 尿蛋白定量(UTP)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测硫氧还蛋白(TRX)、TXNIP 和 NLRP3 蛋白的表达情况;免疫组化法检测 NLRP3、TRX、TXNIP、接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、转化生长因子-β(TGF-β)、IV 型胶原蛋白(Collagen IV)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和调纤连蛋白(FN)的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血 SCr、BUN、24 h UTP 水平明显增高(P<0.05),TRX、TXNIP、NLRP3、ASC、TGF-β、Collagen IV、α-SMA 和 FN 蛋白显著增高(P<0.01),肾间质发生显著纤维化;与模型组比较,大黄泄浊方各剂量组和尿毒清颗粒组血 SCr、BUN、24 h UTP 水平均有不同程度降低(P<0.05),TRX、TXNIP、NLRP3、ASC、TGF-β、Collagen IV、α-SMA 和 FN 蛋白显著降低(P<0.01),肾间质纤维化不同程度改善。结论:大黄泄浊方可保护慢性肾衰竭大鼠肾功能、延缓肾间质纤维化。

[关键词] 大黄泄浊方;慢性肾衰竭;肾间质纤维化;氧化应激;硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP);NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0081-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221944

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220808.1728.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-09 14:03

Effect of Dahuang Xiezhuo Prescription on Renal Interstitial Fibrosis of Rats with 5/6 Nephrectomy by Regulating ROS/TXNIP/NLRP3 Pathway

CAO Wenxuan^{1,2}, XIN Xin^{1,2}, TAN Miao³, GAO Fei⁴, YANG Fengwen², CHEN Suzhi²,
REN Meifang², TAN Jinchuan^{2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China;

3. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

4. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Dahuang Xiezhuo prescription on the changes in renal pathology and reactive oxygen species (ROS)/thioredoxin-interacting protein (TXNIP)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) pathway expression in the kidney tissues of rats with 5/6 nephrectomy, and to explore the

[收稿日期] 2022-04-25

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2021030)

[第一作者] 曹雯萱,在读硕士,从事中西医结合肾病研究,E-mail:5829607010@qq.com

[通信作者] *檀金川,教授,博士生导师,从事中西医结合肾病研究,E-mail:1955981973@qq.com

mechanism of Dahuang Xiezhuo prescription in protecting renal function and delaying renal interstitial fibrosis and the possibility. **Method:** Ninety healthy male SD rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, low, medium, and high-dose ($6.825, 13.65, 27.30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) Dahuang Xiezhuo prescription groups, and a Niaoduqing granule group ($2.60 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Except the sham operation group, 5/6 nephrectomy was used to replicate the rat model of chronic renal failure (CRF). After modeling, each administration group was given the corresponding dose of drug suspension by intragastric administration, once a day for consecutive 8 weeks. After administration, serum creatinine (SCr) and urea nitrogen (BUN) levels and 24 h urinary protein quantification (UTP) levels were detected. Western blot assay was used to detect the protein expressions of thioredoxin (TRX), TXNIP, and NLRP3. The protein expressions of TRX, TXNIP, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), transformation growth factor- β (TGF- β), Collagen IV, α -smooth muscle actin (α -SMA), and fibronectin (FN) were detected by immunohistochemistry. **Result:** As compared with the sham operation group, serum levels of SCr, BUN, and UTP in the model group were increased ($P<0.05$), TRX, TXNIP, NLRP3, ASC, TGF- β , Collagen IV, α -SMA, and FN proteins were increased ($P<0.01$), and renal interstitial fibrosis significantly occurred. As compared with the model group, the levels of SCr, 24 h BUN, and UTP in the low, medium, and high-dose Dahuang Xiezhuo prescription groups and the Niaoduqing granule group were decreased to varying degrees ($P<0.05$), TRX, TXNIP, NLRP3, ASC, TGF- β , Collagen IV, α -SMA, and FN were decreased ($P<0.01$), and renal interstitial fibrosis was improved to varying degrees. **Conclusion:** Dahuang Xiezhuo prescription can protect renal function and delay renal interstitial fibrosis in rats with CRF.

[Keywords] Dahuang Xiezhuo prescription; chronic renal failure; renal interstitial fibrosis; oxidative stress; thioredoxin-interacting protein (TXNIP); NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)

慢性肾功能衰竭(CRF)为各种慢性肾脏疾病导致的肾脏功能障碍,水、电解质代谢功能紊乱的临床综合征。与多种因素有关,包括基因、生活方式、环境等,CRF病情呈进行性发展,病情迁延,复杂多变给临床治疗带来极大挑战,随着患病人群不断增加,慢性肾衰竭已成为全球共同的公共卫生问题。肾间质纤维化(RIF)为所有慢性肾脏病进展的共同途径,对CRF的发展起着至关重要的作用,因此,延缓肾间质纤维化的进展成为慢性肾衰竭防治中至关重要的问题^[1]。大量研究证实,RIF的形成与发展与多种细胞因子和信号通路的异常表达调控相关,氧化应激在其中起着至关重要的作用^[2],活性氧(ROS)是具有很高生物活性的含氧化合物的总称,其在细胞内外代谢过程中可以产生,ROS的主要来源可能是线粒体损伤,线粒体损伤可引起炎性小体的激活。硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)是一种参与细胞增殖^[3]、分化和凋亡的氧化应激调节因子,TXNIP还通过蛋白质结合抑制内源性抗氧化剂硫氧还蛋白(TRX)的抗氧化活性^[4],使机体的氧化应激水平提高,ROS主要通过硫氧还蛋白相互作用蛋白TXNIP反应从TRX中释放激活NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎性小体^[5],而抑制ROS/TXNIP/NLRP3

信号通路,可以减轻CRF大鼠肾小管损伤,延缓肾间质纤维化进程,保护CRF大鼠的肾功能。

近年来中医药在治疗CRF中发挥着举足轻重的作用,最大效果的改善了疾病的愈后,提高了患者的生存率和生活质量。慢性肾衰竭作为现代医学病名范畴,从临床症状上可归结于“溺毒”“关格”“水肿”“癃闭”等范畴。大黄泄浊方是河北省名中医檀金川教授治疗CRF的常用方剂,在临床中疗效显著,由大黄、黄芪、丹参、当归、地龙、水牛角、醋龟甲、土茯苓、积雪草,9味中药组成,补肾益气,活血解毒。本课题组前期研究证明,大黄泄浊方在临床中的应用取得良好的效果^[6],此外大黄泄浊方可以下调ERS相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、C/EBP同源蛋白(CHOP)的表达、抑制内质网应激(ERS)的激活,从而改善肾间质纤维化进程^[7],CRF患者常见病因病机多为脾肾两虚,湿热瘀蕴结,大黄泄浊方正是由此为出发点研制,以ROS/TXNIP/NLRP3信号通路为方向,进一步探讨大黄泄浊方对5/6肾切除大鼠氧化应激的影响,及可能的机制,为临床诊治CRF提供新的方向。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康SD雄性大鼠,6~8周龄,体

质量(160±20)g,90只,购自辽宁长生生物技术有限公司,动物合格证号SCXK(辽)2020-0001;在河北中医学院SPF级实验动物中心饲养,自由进食及饮水。本实验由河北中医学院动物伦理委员会批准,批号DWLL2019035。

1.2 药物 大黄泄浊方所有中药均来自于河北省中医院中药房,中药配方颗粒由广东一方制药有限公司提供(药物批号分别为大黄0060243、黄芪0071088、土茯苓0080923、水牛角丝0066623、丹参0071563、当归0070963、醋龟甲0076823、地龙0057083、积雪草0055443),中药配方颗粒生药含量分别为大黄10g、黄芪25g、土茯苓20g、水牛角丝15g、丹参12g、当归10g、醋龟甲15g、地龙9g、积雪草15g;尿毒清颗粒(5g×18袋,由内蒙古康臣药业有限责任公司生产,国药准字Z20073256)。

1.3 试剂 血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、24h尿蛋白定量(24hUTP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为C013、C011、C012、C035);苏木素-伊红(HE)染色液、马松(Masson)染色液(北京索莱宝有限公司,批号分别为G1120、G1340);TRX、TXNIP、NLRP3、ASC、TGF-β、Collagen IV、α-SMA、FN、山羊抗兔二抗(美国Affinity公司,批号分别为AF7577、DF7506、DF7438、DF6304、AF1027、AF0510、AF1032、AF5335、S0001)。

1.4 仪器 7170A型全自动生化分析仪、H-7650型透射电镜(日本日立公司);Multiskan FC型酶标仪、NanoDrop 2000型紫外-可见分光光度计(美国Thermo Fisher公司);RM2015型切片机(德国徕卡公司);BX53型显微镜(日本Olympus公司);Mini-PRO TEAN3型电泳系统、Mini Trans-Blot型转移系统(美国伯乐公司);Kodak Image Station 2000MM型成像系统(美国Kodak公司)。

2 方法

2.1 模型制备 按照5/6肾切除法制备CRF大鼠模型^[8]。戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,使其呈俯卧位固定于手术台上,剃左侧背侧毛、备皮、常规消毒,距左肋脊角1.5cm处做一纵向皮肤切口(长约3cm),逐层分离皮肤各层进入后腹腔,暴露左肾,动脉夹夹闭左侧肾蒂,切除以肾皮质为主的2/3肾组织,明胶海绵垫压迫止血,观察无活动性出血后复位左肾,逐层缝合切口并包扎,术后腹腔注射青霉素以预防感染。1周后进行第2次手术,按照上述方法行右肾全切术。术后4周,随机抽取2只假手术组和2只造模组化验检测SCr、BUN、UTP水平,

SCr、BUN、24hUTP水平显著升高,肾脏病理形态学显示肾组织有明显的纤维化,提示模型制备成功。

2.2 分组、干预、取材及固定 90只健康的SD雄性大鼠采用随机数字表法随机分为假手术组、模型组、大黄泄浊方低、中、高剂量组、尿毒清颗粒组,每组均15只。假手术组仅做双肾被膜剥离术,其余5组均按照2.1方法制备CRF大鼠模型,模型复制成功后,各给药组均按照相应剂量灌胃治疗。依据人与大鼠体表面积折算法计算大鼠的临床等效剂量,大黄泄浊方中剂量给药量为13.65g·kg⁻¹,以中剂量的1/2、2倍为低、高剂量(6.825、27.30g·kg⁻¹),尿毒清颗粒组给药量2.60g·kg⁻¹·d⁻¹,以大鼠10mL·kg⁻¹的体质量标准灌胃给药,每日1次,连续给药8周。假手术组、模型组在同等时间点给予同等剂量的蒸馏水灌胃。

2.3 血清生化指标检测及尿蛋白定量检测 全自动生化分析仪检测大鼠血清中BUN、SCr水平,尿液分析仪检测24hUTP水平。严格按照试剂盒要求进行。

2.4 肾脏病理学检查 HE、Masson染色观察大鼠肾脏病理改变4%多聚甲醛固定肾组织,经乙醇脱水后石蜡包埋、切片。采用HE、Masson染色法光学显微镜下观察并拍照。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测TRX、TXNIP和NLRP3蛋白的表达 Western blot检测TRX、TXNIP和NLRP3相关蛋白表达水平,将肾组织研磨均匀,置于无菌离心管中,加入RIPA裂解液,按照试剂盒说明步骤提取肾组织蛋白并测定各组蛋白浓度。取总蛋白50μg与Loading buffer混合后100℃变性5min,使用10%SDS-PAGE凝胶电泳2h后进行PVDF转膜1h。使用5%BSA恒温孵育PVDF膜1.5h后,加入TRX一抗(1:2000)、TXNIP(1:2000)、NLRP3(1:2000)、β-actin(1:5000),4℃孵育过夜。加入二抗(1:5000)孵育1h后采用ECL法进行显色,用Image J软件计算各组条带的灰度值。

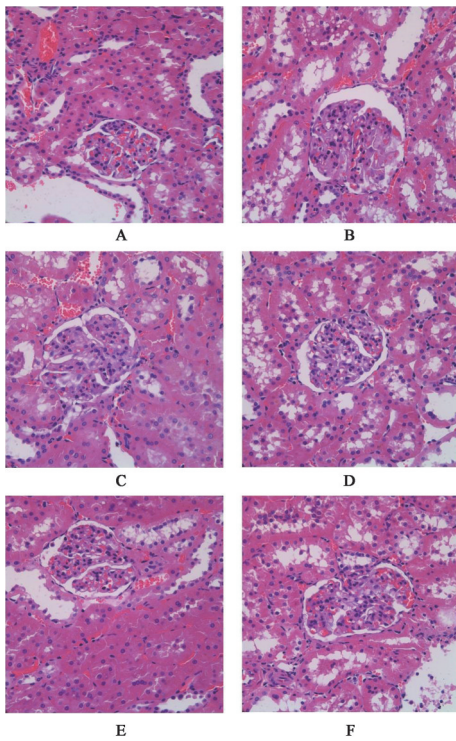
2.6 免疫组化法检测TRX、TXNIP、NLRP3、ASC、TGF-β、Collagen IV、α-SMA和FN蛋白的表达 取肾组织切片,脱蜡、水化、细胞通透、封闭内源性过氧化物酶,抗原修复,山羊血清封闭,加入稀释好的一抗(1:500),4℃孵育过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次后滴加稀释好的二抗(1:500),37℃孵育。PBS清洗,DAB避光显色,镜下观察直到棕褐色阳

性结果为止,水洗、复染、脱水、透明、封片。使用Image Pro Plus 6.0软件进行结果分析。

2.7 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多重比较采用Tukey法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CRF大鼠肾脏病理改变的影响 正常组大鼠肾脏结构正常,未见明显变化,模型组大鼠可见左残肾组织代偿性肥大,外表被增生的纤维组织包裹,与周围组织黏连,色暗红,表面粗糙,切面可见肾皮质增厚,色浅淡,皮髓质分界不清。见图1和图2。



注:A.正常组;B.模型组;C.大黄泄浊方低剂量组;D.大黄泄浊方中剂量组;E.大黄泄浊方高剂量组;F.尿毒清颗粒组(图2-图11同)

图1 大黄泄浊方对CRF肾切除大鼠肾脏病理学的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on pathological in kidney of CRF rats (HE,×400)

3.2 对CRF大鼠血清SCr、BUN水平及24 h UTP的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清SCr、BUN、24 h UTP指标水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,大黄泄浊方低、中、高剂量组和尿毒清组大鼠SCr、BUN、24 h UTP均有不同程度下降($P < 0.05$);与大黄泄浊方低剂量组比较,大黄泄浊方中、高剂

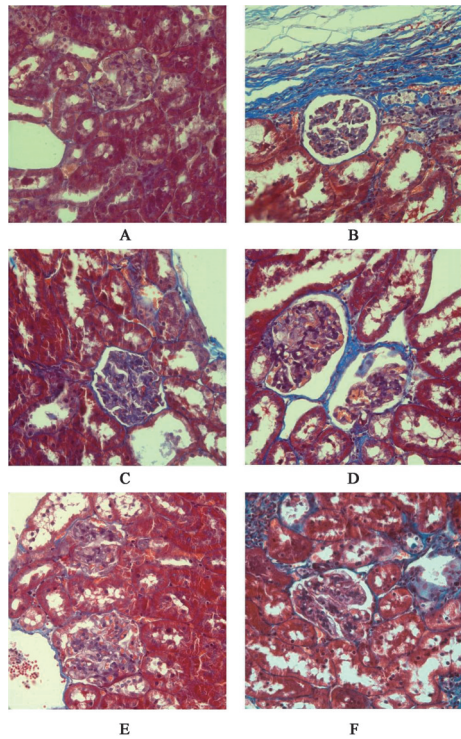


图2 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏病理学的影响(Masson,×400)

Fig. 2 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on pathological in kidney of CRF rats (Masson,×400)

量组和尿毒清组大鼠SCr、BUN、24 h UTP指标有不同程度的下降($P < 0.05$);与尿毒清组比较,大黄泄浊方中、高剂量组大鼠SCr、BUN、24 h UTP指标有不同程度下降($P < 0.05$)。见表1。

3.3 对CRF大鼠肾组织中TRX、TXNIP和NLRP3蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠TRX、TXNIP和NLRP3蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,大黄泄浊方低、中、高剂量组和尿毒清组大鼠TRX、TXNIP和NLRP3蛋白表达显著下降($P < 0.01$);与大黄泄浊方低剂量组比较,大黄泄浊方中、高剂量组和尿毒清组大鼠TRX、TXNIP和NLRP3蛋白表达显著下降($P < 0.01$);与尿毒清组比较,大黄泄浊方中、高剂量组大鼠TRX、TXNIP和NLRP3蛋白表达显著下降($P < 0.01$)。见图3、表2。

3.4 对CRF大鼠肾脏TRX、TXNIP、NLRP3、ASC蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠TRX、TXNIP、NLRP3表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,大黄泄浊方低、中、高剂量组和尿毒清组大鼠TRX、TXNIP和NLRP3表达显著下降($P < 0.01$);与大黄泄浊方低剂量组比较,大黄泄浊方中、高剂量组和尿毒清组大鼠TRX、TXNIP和NLRP3表达明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);与尿毒清组比较,

表 1 大黄泄浊方对 CRF 大鼠血清 SCr、BUN 水平及 24 h UTP 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on levels of serum SCr, BUN and 24 h UTP in CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h UTP/ $\text{mg}\cdot 24\text{ h}^{-1}$
正常组		37.55±1.03	6.26±0.67	4.72±0.47
模型组		116.70±1.16 ¹⁾	23.12±0.57 ¹⁾	25.17±1.04 ¹⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	110.54±0.81 ³⁾	21.41±0.69 ³⁾	23.92±1.02 ³⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	91.30±1.08 ^{3,5,7)}	17.13±0.87 ^{3,5,7)}	20.22±1.18 ^{3,5,7)}
大黄泄浊方高剂量组	27.30	89.18±1.17 ^{3,5,7)}	16.64±0.81 ^{3,5,7)}	19.34±0.95 ^{3,5,7)}
尿毒清颗粒组	2.60	107.26±0.85 ^{5,7)}	20.58±0.59 ^{5,7)}	22.76±1.26 ^{5,7)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与大黄泄浊方低剂量组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与尿毒清颗粒组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$ (表 2-表 4 同)

大黄泄浊方中、高剂量组大鼠 TRX、TXNIP 和 NLRP3 表达显著下降($P<0.01$)。见图 4-图 7、表 3。

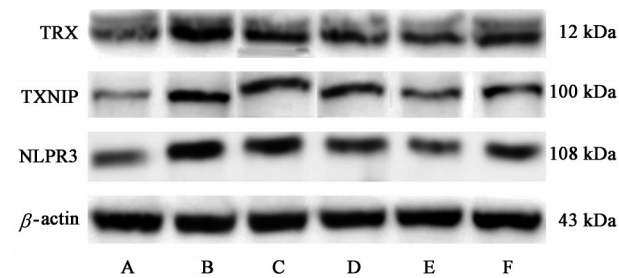


图 3 CRF 大鼠 TRX、TXNIP、NLRP3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of TRX, TXNIP and NLRP3 protein expression of in kidney tissues of CRF rats

3.5 对 CRF 大鼠肾脏中 TGF- β 、Collagen IV、 α -SMA、FN 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TGF- β 、Collagen IV、 α -SMA、FN 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,大黄泄浊方低、中、高剂量组和尿毒清组大鼠 TGF- β 、Collagen IV、 α -SMA、FN 表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);与大黄泄浊方低剂量组比较,大黄泄浊方中、高剂量组和尿毒清组大鼠 TGF- β 、Collagen IV、 α -SMA、FN 表达显著下降($P<0.01$);与尿毒清组比较,大黄泄浊方中、高剂量组大鼠 TGF- β 、Collagen IV、 α -SMA、FN 表达显著下降($P<0.01$)。见图 8-

表 2 大黄泄浊方对 CRF 大鼠肾组织中 TRX、TXNIP、NLRP3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of TRX, TXNIP, NLRP3 protein in kidney tissues of CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TRX/ β -actin	TXNIP/ β -actin	NLRP3/ β -actin
正常组		0.065±0.03	0.23±0.01	0.39±0.01
模型组		1.14±0.03 ²⁾	0.76±0.02 ²⁾	0.86±0.04 ²⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	0.91±0.02 ⁴⁾	0.54±0.01 ⁴⁾	0.74±0.02 ⁴⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	0.81±0.02 ^{4,6,8)}	0.60±0.06 ^{4,6,8)}	0.63±0.02 ^{4,6,8)}
大黄泄浊方高剂量组	27.30	0.69±0.04 ^{4,6,8)}	0.42±0.02 ^{4,6,8)}	0.43±0.02 ^{4,6,8)}
尿毒清颗粒组	2.60	0.86±0.02 ^{4,6)}	0.47±0.01 ^{4,6)}	0.55±0.03 ^{4,6)}

表 3 大黄泄浊方对 CRF 大鼠肾组织中 TRX、TXNIP、NLRP3、ASC 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of TRX, TXNIP, NLRP3 and ASC protein in kidney tissues of CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TRX	TXNIP	NLRP3	ASC
正常组		0.155 7±0.00 1	0.118 2±0.001 5	0.010 9±0.001 4	0.123 6±0.001 4
模型组		0.215 1±0.001 9 ²⁾	0.204 7±0.001 9 ²⁾	0.066 9±0.001 3 ²⁾	0.162 4±0.002 1 ²⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	0.191 1±0.003 8 ⁴⁾	0.179 7±0.002 4 ⁴⁾	0.059 7±0.007 0 ⁴⁾	0.148 1±0.000 6 ⁴⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	0.178 7±0.001 0 ^{4,6,8)}	0.156 5±0.001 5 ^{4,6,8)}	0.050 8±0.000 4 ^{4,5,8)}	0.130 8±0.000 2 ^{4,6,8)}
大黄泄浊方高剂量组	27.30	0.165 2±0.000 7 ^{4,6,8)}	0.132 6±0.000 8 ^{4,6,8)}	0.036 7±0.002 4 ^{4,6,8)}	0.119 0±0.000 5 ^{4,6,8)}
尿毒清颗粒组	2.60	0.169 9±0.001 8 ^{4,6)}	0.166 0±0.002 0 ^{4,6)}	0.060 8±0.000 3 ^{4,6)}	0.126 0±0.001 8 ^{4,6)}

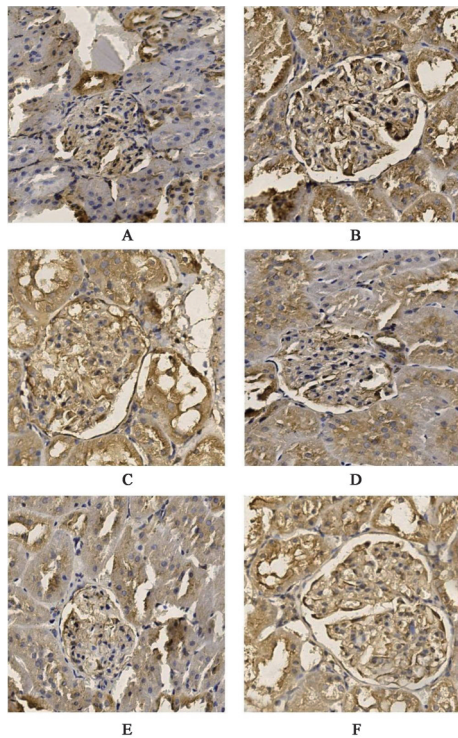


图4 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织TRX蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of TRX protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

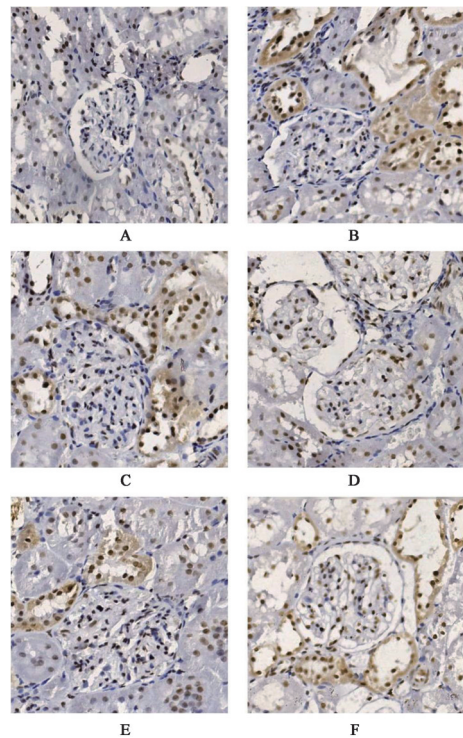


图6 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织NLRP3蛋白表达的影响(IHC,×400)

Fig. 6 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of NLRP3 protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

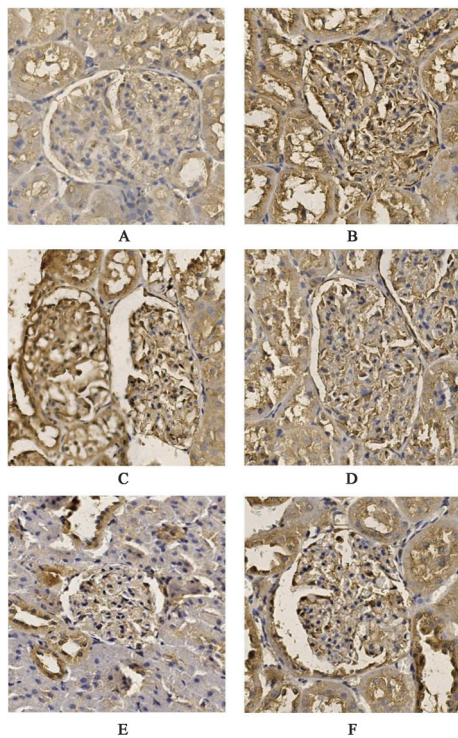


图5 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织TXNIP蛋白表达的影响(IHC,×400)

Fig. 5 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of TXNIP protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

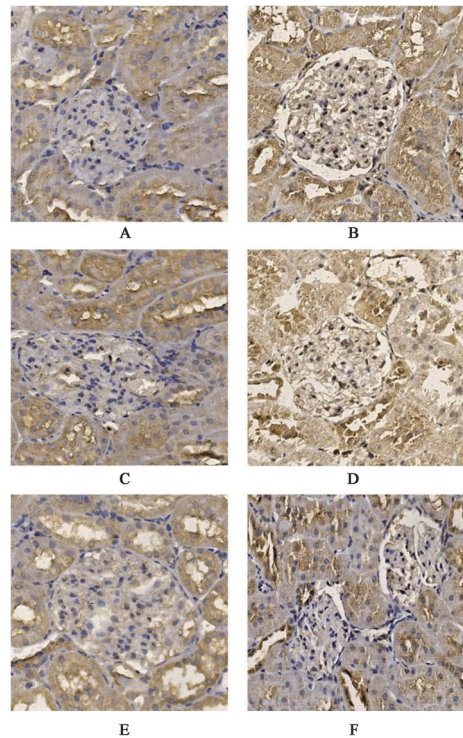


图7 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织ASC蛋白表达的影响(IHC,×400)

Fig. 7 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of ASC protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

图11、表4。

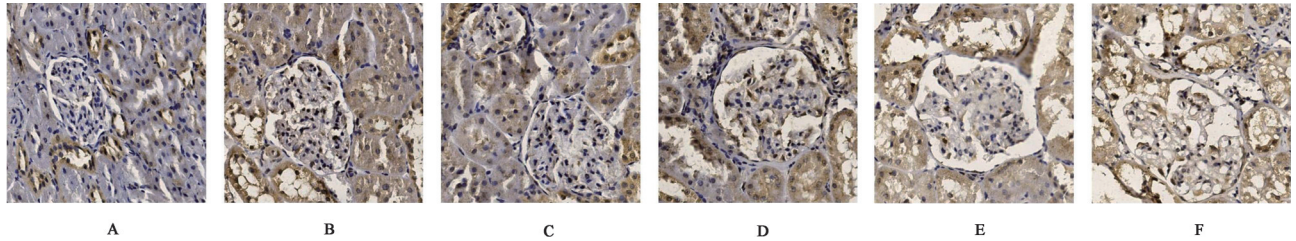


图8 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中TGF-β蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 8 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of TGF-β protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

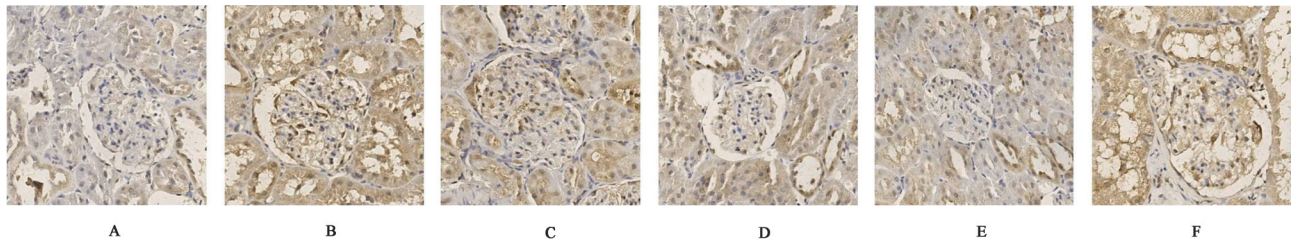


图9 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中Collagen IV蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 9 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of Collagen IV protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

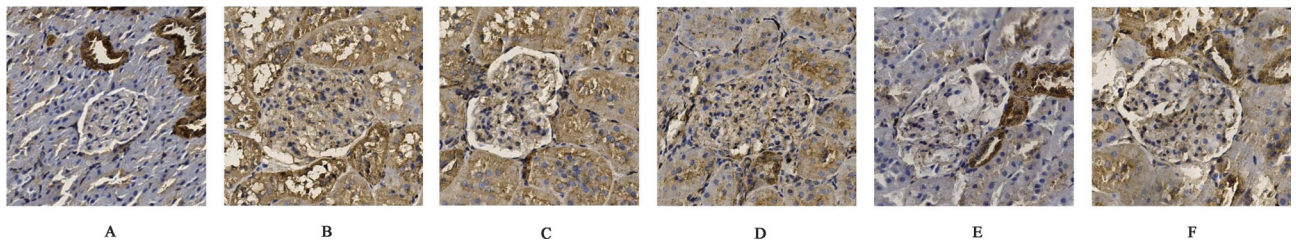


图10 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中α-SMA蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 10 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of α-SMA protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

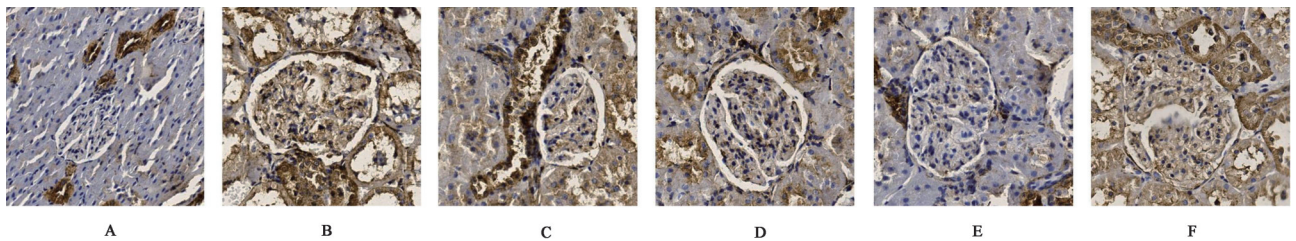


图11 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中FN蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 11 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of FN protein in kidney tissues of CRF rats (IHC, ×400)

表4 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中TGF-β、Collagen IV、α-SMA、FN蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of TGF-β, Collagen IV, α-SMA and FN protein in kidney tissues of CRF rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β	Collagen IV	α-SMA	FN
正常组		0.064 6±0.000 4	0.065 1±0.000 7	0.092 1±0.005 4	0.051 0±0.002 1
模型组		0.166 6±0.001 2 ²⁾	0.116 1±0.000 4 ²⁾	0.208 0±0.003 5 ²⁾	0.220 0±0.003 0 ²⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	0.133 9±0.000 7 ⁴⁾	0.114 5±0.000 3 ⁴⁾	0.196 3±0.001 3 ⁴⁾	0.211 3±0.007 6 ³⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	0.132 0±0.000 6 ^{4,6,7)}	0.091 8±0.001 0 ^{4,6,8)}	0.173 6±0.004 0 ^{4,6,8)}	0.162 9±0.001 7 ^{4,6,8)}
大黄泄浊方高剂量组	27.30	0.123 9±0.000 3 ^{4,6,8)}	0.084 4±0.001 3 ^{4,6,8)}	0.116 6±0.000 2 ^{4,6,8)}	0.075 1±0.001 6 ^{4,6,8)}
尿毒清颗粒组	2.60	0.130 1±0.001 5 ^{4,6)}	0.097 4±0.003 8 ^{4,6)}	0.182 4±0.002 1 ^{4,6)}	0.176 7±0.001 4 ^{4,6)}

4 讨论

近年来,CRF患病率呈逐年上升的趋势,采取透析治疗和肾脏移植治疗的患者也逐步增多,CRF的病理基础之一就是肾间质纤维化^[9]。肾间质纤维化的过程复杂迁延,因素繁多,中医药辨证施治,多靶点整体调节的特点可以很好的延缓病情的进展。

中医中无CRF的病名,随着中医诊疗的规范化发展,现“慢性肾衰”病名已被广泛的采用^[10],依据该病发病时的主症特点,可对应于中医中的水肿、癃闭、关格、溺毒等,以小便量少,毒素蓄积为特点,可出现水肿,排尿困难,甚则小便闭塞可与呕吐并见的症状,本病将本虚标实视为基本病机,并且将本虚标实贯穿疾病始终,虚则因脾肾阳虚,脾失健运,肾气化失常,湿浊内蕴,湿浊瘀阻塞;实则为外邪侵袭,气血运行不畅,湿浊内瘀,内外相和,气机阻塞,气滞则血瘀,肾络的瘀阻与肾脏的虚损也也逐渐加重。檀金川教授从健脾益肾,祛湿化浊为出发点,初病治湿,中期活血,久病通络,大黄泄浊方中,黄芪健脾益气,实验证明,黄芪具有的双向调节提高免疫和免疫抑制的作用和高凝状态的改善,都能够在保护肾脏功能中发挥重要作用^[11],大黄泻下攻积,凉血解毒,近年来,研究发现大黄酚及大黄素均可以抑制相关蛋白的表达从而达到延缓肾间质纤维化的作用^[12]积雪草、土茯苓清湿热,活血利尿,在减少尿蛋白方面有显著疗效,当归、丹参活血祛瘀,补血养血,达到活血而不留瘀,祛邪而不伤正的作用,醋龟甲滋肝肾之阴并清热潜阳、水牛角丝清热凉血;虫类药物地龙,善行走窜,行肾络之瘀、清久积之邪。诸药合用,切合“脾肾亏虚、湿热瘀蕴结”的基本病机,该方的组合配伍,不仅符合中医药方原则,集众药之所长,更结合了现代药理实验研究成果。

现代医学中,CRF是多种慢性肾脏病持续进展导致肾功能严重损伤,肾脏多种机能减退,在最新的慢性肾脏病诊断并准中为4~5期,最终可发展为终末期肾病(ESRD)。CRF患者因肾小球滤过率下降,可出现全身各系统代谢紊乱,多脏器受累为主要表现的临床综合征^[13]。氧化应激是指机体或细胞内ROS大量产生和抗氧化功能严重减退,两者平衡破坏,所引起的组织及细胞损伤^[14],正常情况下,机体的活性氧可以被抗氧化系统驱除,但是机体在应激状态下则会发生抗氧化系统失衡,肾脏是是对氧化应激高度敏感的器官之一,慢性肾脏病的发展、过程中,伴随着抗氧化能力减弱以及氧化应激

的增强,始终有氧化应激的发生,近年来大量研究表明,氧化应激对肾脏的损伤,特别是在肾间质纤维化过程中起重要作用^[15]。而肾间质纤维化又与多种原因引起的细胞外基质改变密不可分,FN就是细胞外基质的重要组成部分,在纤维化早起就可广泛沉积,可以直观的反应肾脏的纤维化^[16]。TGF- β 是肾纤维化发生的关键调控因子,其可以促进成纤维细胞的增殖,产生大量的细胞外基质^[17], α -SMA作为纤维细胞受损激活和表型转化的标志之一,也是预测肾间质纤维化进展的重要指标,研究证明,TGF- β 表达增高的趋势与肾脏中FN和 α -SMA的表达增多趋势一致^[18],也与肾间质损害趋势相一致。因为蛋白质、核酸及脂质可以直接被ROS所损伤,进而破坏细胞结构和功能^[19]所以氧化应激对肾脏损伤机制主要表现在ROS对肾脏有直接损伤作用。TXNIP是调节体内氧化应激水平的硫氧还蛋白(TRX)系统中的重要组成部分,该系统广泛的分布在体内,硫氧还蛋白是细胞内抗氧化应激的主要分子。TXNIP可与TRX结合,负性调节TRX使机体的氧化应激水平升高,近年来多项研究表明,TXNIP表达增高与肾间质纤维化相关^[20],NLRP3炎性小体属于识别受体,具有高度保守性,在一些疾病状态下,TXNIP可以与NLRP3结合从而激活NLRP3炎性小体。促使成纤维细胞的增殖分化,减少系膜细胞对细胞外基质降解,最终加重肾组织纤维化进展^[21]。本研究中提示大黄泄浊方可以通过下调大鼠肾脏中TRX、TXNIP和NLRP3蛋白表达来抑制氧化应激对肾脏的损害,从而发挥肾脏保护作用。

综上所述,大黄泄浊方能明显降低血SCr、血BUN水平,降低UTP水平,减缓RIF进程,其机制可能与抑制ROS/TXNIP/NLRP3通路表达,抑制氧化应激相关。但其详细作用机制仍需进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 韩海燕,路建饶,王新华. 肾衰方改善早中期慢性肾衰竭患者肾功能及纤维化的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(15):166-170
- [2] 罗珊,宋立群,马晓鹏,等. 肾间质纤维化氧化应激相关信号通路与中医药研究进展[J]. 中医药学报2020,48(12):79-84.
- [3] HANA Y C, XUB X X, TANGA C Y, et al. Reactive oxygen species promote tubular injury in diabetic nephropathy: The role of the mitochondrial ros-txnip-nlrp3 biological axis[J]. Redox Biol,2018,16:32-46.

- [4] 靳贺超,梁胜然,张冠文,等. 基于TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路探讨当归补血汤对糖尿病肾病大鼠足细胞焦亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(3):49-57.
- [5] 王俞方,肖启国,王智,等. ROS信号通路调控NLRP3炎症小体在自身免疫性葡萄膜炎发生中的作用[J]. 眼科新进展,2020,40(6):527-532.
- [6] 王泽泽,高飞,于相泽. 数据挖掘檀金川治疗慢性肾功能衰竭用药经验[J]. 天津中医药,2021,38(3):361-365.
- [7] 张欣欣,辛鑫,吴振华,等. 大黄泄浊方对5/6肾切除大鼠肾组织中内质网应激相关蛋白GRP78、CHOP表达的影响[J]. 河北中医药学报,2021,36(6):1-5.
- [8] 沙朝晖,付平,周莉,等. 大鼠5/6肾切除慢性肾功能衰竭动物模型的实验研究[J]. 四川动物,2006,25(3):632-634.
- [9] 刘怡然. mROS-TXNIP-NLRP3信号通路在急性肾脏损伤中的作用研究[D]. 南京:东南大学,2004.
- [10] 齐振强,任鲁颖,冯国庆,等. 慢性肾功能衰竭中医临床研究进展[J]. 中华中医药学刊,2016,8:1673-7717.
- [11] 秦聪,范华平,张秀侠,等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中转化生长因子- β_1 、IV型胶原mRNA表达的影响[J]. 广州中医药大学学报,2014,31(6):928-931.
- [12] 潘秋霞,张城浩,郑兆伟,等. 单味中药防治肾间质纤维化的研究进展[J]. 时珍国医国药,2015,26(7):1721-1723
- [13] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2008:1280.
- [14] GURDIP D, CARMEN H, KAREN M, et al. Radical roles for rage in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond [J]. Int J Mol Sci, 2013,14(10):19891-19910.
- [15] 霍振霞,王保兴. p38 MAPK在氧化应激诱导肾间质纤维化中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志,2016,10(7):1029-1032.
- [16] 王亿平,陈芳,王东,等. 清肾颗粒对慢性肾衰竭湿热证患者氧化应激的干预作用[J]. 中成药,2017,39(1):46-50.
- [17] 麻志恒,钟利平,余柯娜,等. 抗纤灵对5/6肾切除诱导的慢性肾纤维化小鼠模型不同时期Col I、 α -SMA、FN的影响[J]. 中成药,2017,39(1):181-184.
- [18] 谢盛彬,王伟铭,陈楠. UUO模型大鼠肾间质纤维化动态进展及 α -SMA、TGF- β 和VDR表达变化[J]. 上海交通大学学报:医学版,2010,30(7):752-757,796.
- [19] 张义兵,熊玉兰,杜贵友,等. 加味真武汤对肾间质纤维化大鼠TGF- β 及FN表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):168-171.
- [20] HAMADA Y, FUKAGAWA M. A possible role of thioredoxin inter-acting protein in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. Kobe J Med Sci,2007,53(1/2):53-61.
- [21] CHENG X, ZHENG X, SONG Y, et al. Apocynin attenuates renal fibrosis via inhibition of NOXs-ROS-ERK-myofibroblast accumulation in UUO rats [J]. Free Radic Res,2016,50(8):840-852.

[责任编辑 孙丛丛]