

# 抗纤灵方对5/6肾切除小鼠肾组织纤维化作用机制研究

钟利平, 麻志恒, 余柯娜, 何立群\*

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

**[摘要]** **目的:**研究抗纤灵方对5/6肾切除小鼠肾纤维化的作用及机制研究。**方法:**将60只C57小鼠,随机分为假手术组10只和手术组50只,手术组行5/6肾切除术。术后2周,手术组随机分为模型组、抗纤灵低、中、高剂量组(0.1, 0.2, 0.4 mg·kg<sup>-1</sup>)及雷帕霉素组(0.16 μg·kg<sup>-1</sup>),各组10只。各组于术后2周分别给予0.5 mL生理盐水、雷帕霉素及抗纤灵煎剂灌胃。治疗8周后处死小鼠,在处死小鼠前1 d收集24 h小便测24 h尿蛋白(UPRO)定量,眼眶采血测血肌酐(SCr),尿素氮(BUN);取残肾应用免疫荧光法检测肾组织α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达;系用Western blot法检测肾组织I型及III型胶原蛋白表达。**结果:**与假手术组比较,模型组24 h UPRO定量,SCr,BUN,α-SMA,I型及III型胶原表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各治疗组24 h UPRO定量,SCr,BUN,α-SMA,I型及III型胶原表达均有所下降( $P < 0.05$ )。**结论:**抗纤灵方能降低小鼠24 h UPRO定量,改善肾功能,延缓肾纤维化发生,其机制可能与下调α-SMA表达,抑制肾脏I型及III型胶原表达相关。

**[关键词]** 抗纤灵方;肾纤维化;平滑肌肌动蛋白;I型胶原;III型胶原

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0118-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020118

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151210.1446.028.html>

**[网络出版时间]** 2015-12-10 14:46

## Action Mechanism of Kangxianling Decotion on Renal Fibrosis in Mice with 5/6 Nephrectomy

ZHONG Li-ping, MA Zhi-heng, YU Ke-na, HE Li-qun\*

(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect and mechanism of Kangxianling decotion on renal fibrosis in mice with 5/6 nephrectomy. **Method:** The 60 C57 mice were randomly divided into sham operation group ( $n = 10$ ) and operation group ( $n = 50$ ). The patients in operation group underwent 5/6 nephrectomy. After two weeks, the patients in operation group were randomly divided into model group, Kangxianling low, medium and high dose groups (0.1, 0.2, 0.4 mg·kg<sup>-1</sup>) and rapamycin group (0.16 μg·kg<sup>-1</sup>),  $n = 10$  in each group. In each group were given 0.5 mL normal saline, rapamycin and Kangxianling were respectively given by gavage for the groups after two weeks. Mice were sacrificed after 8 weeks of treatment. 1 day before they were sacrificed, 24 h urine was collected to detect 24 h protein, and orbital blood test was taken for serum creatinine, blood urea nitrogen. The remnant kidney was taken to detect α-SMA expression by immunofluorescence method. The type I and III collagen protein expression in renal tissues was detected by Western blot assay. **Result:** Compared with the sham group, 24-hour urinary protein excretion, serum creatinine, blood urea nitrogen, α-SMA, type I and III collagen protein expression were significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, 24-hour urinary protein excretion, serum creatinine, blood urea nitrogen, α-SMA, type I and type III collagen expression

**[收稿日期]** 20150109(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81373615);上海市高校创新团队建设项目(11DZ1973100)

**[第一作者]** 钟利平,博士,主治医师,从事中西医结合防治肾脏病的临床及实验研究,Tel:15316621790,E-mail:15316621790@163.com

**[通讯作者]** \*何立群,博士,博士生导师,主任医师,从事肾脏病的基础及临床研究,Tel:021-5381650-7100,E-mail:heliqun59@163.com

were decreased in each treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Kangxianling docotion can decrease 24 h urinary protein excretion in mice, improve renal function and delay the occurrence of renal fibrosis, and its mechanism may be related to lowering  $\alpha$ -SMA expression and inhibiting type I and type III collagen expression in renal tissues.

[**Key words**] Kangxianling docotion; renal fibrosis; smooth muscle actin; type I collagen; type III collagen

肾纤维化是各种原因导致慢性肾脏疾病进展到终末期肾脏病的共同通路,其主要包括肾小球硬化和肾间质纤维化,因此对肾纤维化形成的中心环节干预治疗将会减少终末期肾脏病发生。肾纤维化形成机制为肾脏固有细胞在炎症刺激和细胞因子作用下导致肾间质中的成纤维细胞增生与分化,并向肌成纤维细胞转化<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)是肌成纤维细胞产生标志,其表达强弱与肾纤维化密切相关,在正常情况下少量表达于血管平滑肌细胞,在大量纤维化形成时将强烈表达于血管平滑肌细胞<sup>[2]</sup>。当肌成纤维细胞形成后会自主增殖、持续分泌并合成不易被降解的 I, III 型胶原蛋白,从而造成细胞外基质(ECM)的合成异常加快,降解速度降低<sup>[3]</sup>。这种合成、降解速度的失衡就促使大量纤维组织生成,使细胞外基质异常沉积,最终导致肾小球硬化、肾间质纤维化。可见下调肾脏  $\alpha$ -SMA 表达,抑制 I, III 型胶原蛋白合成或加快降解是治疗肾纤维化中心环节。抗纤灵方在临床运用多年,能很好减少患者蛋白尿,延缓肾脏病进展,有较好前期临床研究基础,如抗纤灵冲剂对慢性肾衰竭 60 例疗效观察<sup>[4]</sup>。在此实验研究基础上,本次实验的目的将重点探讨抗纤灵方抗肾纤维化机制,是否与下调  $\alpha$ -SMA,抑制 I, III 型胶原蛋白合成或加快降解相关。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级雄性 C57 小鼠 60 只,体重( $18 \pm 2$ ) g,由上海中医药大学动物房提供,合格证号 SCXK(沪)2008-0016。实验小鼠分笼饲养,自由饮水,进食标准普通饲料。

**1.2 药物及试剂** 抗纤灵方(丹参 15 g,桃仁 12 g,当归 12 g,牛膝 15 g,制大黄 9 g)由上海曙光医院中药房提供。雷帕霉(由上海市威奥公司,货号 R706203),血肌酐(SCr)测试盒(苦味酸法,南京建成生物公司提供,批号 c011),尿素氮(BUN)试剂盒(南京建成生物公司提供,批号 c013-2),尿蛋白(UPRO)定量试剂盒(南京建成生物公司,批号 c035-2),兔抗小鼠 I 型胶原,III 型胶原单克隆一抗

(批号 ab292, ab7778),均购买于美国 Abc 公司;山羊抗兔二抗(上海威奥生物公司,批号 BA1081),凝胶试剂盒(上海威奥生物公司,批号 P0012A),蛋白提取试剂盒(上海威奥生物公司,批号 E211-01)。

**1.3 仪器** 5804R 型冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司),keyWrice-D<sup>TM</sup> C3i multifunction 型高速离心机(美国 Thermo 公司),Biophotometerplus 型紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司),STAT FAX 2100 型全自动酶标仪(Awareness Technology Inc),Fvloi 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模<sup>[5]</sup>、分组及给药方法** 60 只 C57 小鼠按随机数据表取出 10 只作为假手术组,其余 50 只 C57 小鼠按照 5/6 肾切除方法制备慢性肾衰模型,以 2% 戊巴比妥钠 0.07 mL 进行小鼠腹腔注射,小鼠麻醉后取右侧卧位充分暴露左肾区,沿左肋脊下缘 1 cm 处消毒 做斜向为切口,在腹膜后取出左肾,剥离周围脂肪及肾包膜,再做弧形切口主要切除肾皮质大约 0.05 g,明胶海绵止血,缝合肌层及皮肤。10 d 后再进行右肾全切除。假手术组只进行左右肾包膜剥离保留肾脏及肾上腺。2 周后再按 SCr 水平分为模型组 10 只、低剂量组 10 只、中剂量组 10 只、高剂量组 10 只、雷帕霉素组 10 只。假手术组及模型组:予自由进食和 0.5 mL 自来水 *ig*。抗纤灵方低、中、高剂量组分别给予抗纤灵方煎剂 0.5 mL *ig*,药物浓度依次为 0.1, 0.2, 0.4 mg·kg<sup>-1</sup> (小鼠体重),每日 *ig* 1 次。对照组:给予 0.5 mL 雷帕霉素 *ig*,药物浓度为 0.16  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup> (小鼠体重),每日 *ig* 1 次。疗程 8 周。

**2.2 肾组织标本采集及制备** 8 周后处死小鼠,取残余肾组织分为 2 份,一份免疫荧光染色,一份肾组织于液氮中速冻后 -80 °C 冰箱保存,以备 Western blot。

**2.3 Western blot 法检测肾组织中 I 型胶原,III 型胶原蛋白表达水平** 取新鲜组织,加入一定比例裂解液超速离心,取上清,分装, -80 °C 保存备用。采

用 BCA 法测定蛋白浓度,使蛋白变性在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,采用湿转方法将蛋白转移到 PVDF 膜上,加入适当稀释一抗(1:1 000)4 ℃ 过夜,后加入二抗(1:1 000)室温孵育 1~2 h,后采用 ECL 法显影,测定积分吸光度值。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学

表 1 抗纤灵方对小鼠 24 h UPRO, BUN, SCr 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of Kangxianling decoction on 24 hours UPRO, BUN, SCr of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	SCr/μmol·L <sup>-1</sup>	24 h UPRO/mg·L <sup>-1</sup>
假手术	-	8.72 ± 1.19	66.77 ± 11.25	2.93 ± 0.70
模型	-	18.25 ± 1.21 <sup>1)</sup>	165.28 ± 7.42 <sup>1)</sup>	51.32 ± 1.32 <sup>1)</sup>
抗纤灵	0.1	15.21 ± 0.32 <sup>2)</sup>	112.42 ± 14.32 <sup>2)</sup>	32.47 ± 1.72 <sup>2)</sup>
	0.2	13.12 ± 1.28 <sup>2)</sup>	109.42 ± 11.85 <sup>2)</sup>	26.07 ± 1.90 <sup>2)</sup>
	0.4	11.10 ± 1.58 <sup>2)</sup>	90.24 ± 10.78 <sup>2)</sup>	16.86 ± 1.10 <sup>2)</sup>
雷帕霉素	0.000 16	10.11 ± 1.35 <sup>2)</sup>	80.25 ± 17.60 <sup>2)</sup>	10.02 ± 1.58 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

**3.2 对肾组织中 α-SMA 荧光表达量影响** 与假手术组比较,模型组 α-SMA 荧光表达量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组表达量均减少 ( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖关系。见表 2。

表 2 抗纤灵方对肾组织中 α-SMA 荧光表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of Kangxianling decoction on expression of α-SMA fluorescence in renal tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	α-SMA/%
假手术	-	0.72 ± 0.06
模型	-	45.25 ± 1.12 <sup>1)</sup>
抗纤灵	0.1	21.24 ± 3.25 <sup>2)</sup>
	0.2	20.13 ± 1.23 <sup>2)</sup>
	0.4	4.41 ± 1.73 <sup>2)</sup>
雷帕霉素	0.000 16	3.12 ± 2.03 <sup>2)</sup>

**3.3 对肾组织中 I 型, III 型胶原蛋白表达的影响** 与假手术组比较,模型组肾组织中的 I 型, III 型胶原表达量均显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较各治疗组 I 型, III 型胶原表达量均逐渐下降 ( $P < 0.05$ )。见表 3, 图 1。

#### 4 讨论

肾纤维化包括肾小球硬化和肾间质纤维化,肾小球是由入球小动脉和出球小动脉缠绕形成的毛细血管球,在肾脏呈立体网状分布,与中医经络学中络

意义。

#### 3 结果

**3.1 对小鼠 24 h UPRO, BUN, SCr 的影响** 与假手术组比较,模型组 24 h UPRO, BUN, SCr 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ),说明造模成功;与模型组比较,抗纤灵方各剂量组均能明显降低 24 h UPRO, BUN, SCr 含量 ( $P < 0.05$ ),说明抗纤灵方具有降低小鼠 UPRO, 缓解肾功能进展作用。见表 1。

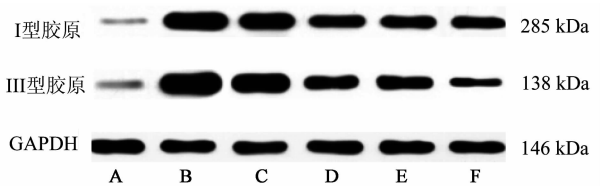


图 1 抗纤灵方对肾组织中 I 型, III 型胶原蛋白表达的影响  
A. 假手术组; B. 模型组; C. 抗纤灵方 0.1 mg·kg<sup>-1</sup> 组; D. 抗纤灵方 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> 组; E. 抗纤灵方 0.4 mg·kg<sup>-1</sup> 组; F. 雷帕霉素组

Fig. 1 Effects of Kangxianling decoction on renal tissue expression of type I, III collagen in renal tissue

表 3 抗纤灵方对肾组织中 I 型, III 型胶原蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effects of Kangxianling decoction on renal tissue expression of type I, III collagen in renal tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	I 胶原	III 胶原
假手术	-	1.16 ± 0.01	1.15 ± 0.02
模型	-	12.44 ± 0.02 <sup>1)</sup>	11.51 ± 0.03 <sup>1)</sup>
抗纤灵	0.1	11.14 ± 0.01 <sup>2)</sup>	10.79 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	0.2	9.63 ± 0.01 <sup>2)</sup>	8.25 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	0.4	6.48 ± 0.01 <sup>2)</sup>	4.39 ± 0.02 <sup>2)</sup>
雷帕霉素	0.000 16	4.46 ± 0.01 <sup>2)</sup>	3.38 ± 0.03 <sup>2)</sup>

脉结构及其相似。祖国医学无“肾纤维化”一词,可归属于“虚劳”、“关格”、“溺毒”等范畴<sup>[6]</sup>。中医基

本病机为人体正气亏虚,或毒阻血脉,或气虚血滞,久病入络,造成气滞、血瘀、毒留而形成微型癥积,聚积于肾络,即形成肾络微型癥积。据此病因病机其治疗大法为“益气补肾,活血化瘀”为主。根据上述肾纤维化治疗原则基础上创建抗纤灵方,由丹参、桃仁、当归、牛膝、大黄组成,方中丹参性微寒,益气补血活血;桃仁性平,祛瘀活血;当归性温,补血活血;牛膝性平,补肾活血;制大黄性寒,清热泻浊活血,纵观全方以活血为主。具有活血化瘀补血作用。现代药理研究显示丹参总酚酸组能减少肾间质炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞萎缩减少,肾间质纤维化减少<sup>[7]</sup>,当归有改善肾小球滤过功能及肾小管重吸收功能<sup>[8]</sup>。

肾纤维化其基本本质为络脉瘀阻,血瘀证形成。临床实验研究血瘀证患者与非血瘀患者纤维化相关指标间关系发现 TIMP-1,Ⅲ胶原及透明质酸之间有差别其结论为血瘀证患者血清 TIMP-1,Ⅲ胶原及透明质酸均高于非血瘀证组,说明血瘀是导致纤维化重要病因病机<sup>[9]</sup>。在纤维化形成早期,Ⅰ型和Ⅲ胶原沉积数量最多,大量Ⅰ型和Ⅲ型胶原产生及沉积预示着纤维化形成早期或活动期表现,防治Ⅰ型和Ⅲ型胶原产生及沉积有利于防止纤维化发生<sup>[10]</sup>。研究显示活血化瘀中药能明显抑制成纤维细胞增殖及胶原合成,其机制与降低组织中Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白相关<sup>[11]</sup>。在研究益气活血中药与Ⅰ,Ⅲ型胶原纤维动态关系中同样发现,益气活血中药能明显减少大鼠组织中Ⅰ,Ⅲ型胶原纤维增生,减少组织纤维化<sup>[12]</sup>。本实验结果显示,模型组较其他治疗组 $\alpha$ -SMA,Ⅰ型,Ⅲ型胶原表达量明显增加,抗纤灵各治疗组随着剂量增大, $\alpha$ -SMA,Ⅰ型,Ⅲ型胶原在肾脏表达量逐渐减少。提示抗纤灵方通过降低 $\alpha$ -SMA,Ⅰ型,Ⅲ型胶原在肾脏表达,而起到保护肾脏,抗肾纤维化作用。

综上所述,具有益气活血化瘀补肾作用抗纤灵方通过减少肾脏炎症细胞浸润,抑制系膜细胞增生,

改善肾小球率过滤,下调 $\alpha$ -SMA表达,抑制Ⅰ型胶原及Ⅲ胶原增殖及肾脏沉积,而起到保护肾脏,抗肾纤维化作用,并且其作用与剂量呈依赖关系。

#### [参考文献]

- [1] 辛冰牧,杨红振,胡卓伟. 肾纤维化发病机制及治疗学研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(5):349-354.
- [2] 李林蔚,周景华,刘华生. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 FN 及 $\alpha$ -SMA 的影响[J]. 黑龙江医药,2014,27(2):265-267.
- [3] 苏赵亮,王映梅,刘嫣芳. 等. IL-17 对小鼠心肌成纤维细胞Ⅰ/Ⅲ胶原表达的作用研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(9):897-900.
- [4] 王怡,何立群,郑平东. 抗纤灵冲剂对慢性肾衰竭 60 例疗效观察[J]. 中医杂志,2003,44(12):923-925.
- [5] 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,2006,26(3):632-634.
- [6] 张悦,李靖,刘克剑. 抗纤灵对阿霉素肾病大鼠 Smads 信号通路分子的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(12):1094-1098.
- [7] 王冬. 黄芪丹参药对及其有效组分抗肾纤维化的实验研究[D]. 遵义:遵义医学院,2012.
- [8] 李曦,张丽红,王晓晓,等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材,2013,36(6):1023-1028.
- [9] 韩冉. 糖尿病肾病血瘀证与非血瘀证 TIMP-1、HAPC Ⅲ 的检测分析[D]. 北京:北京中医药大学,2009.
- [10] 郑向鹏,滑炎卿,张国祯,等. Ⅲ型胶原纤维在实验性特发性肺纤维化早期的动态研究[J]. 上海医学,2012,25(4):205-209.
- [11] 刘燕,傅跃先,邱林,等. 红花对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞及Ⅰ、Ⅲ型胶原影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,37(13):25-29.
- [12] 李凤玉,王炳胜,刘秀芳,等. 益气活血中药对放射损伤大鼠肺组织转化生长因子和胶原纤维的影响[J]. 华南国防医学杂志,2010,24(3):185-188.

[责任编辑 周冰冰]