

· 药理 ·

芪归益肾方延缓单侧输尿管梗阻小鼠肾脏 纤维化进展机制的探讨

魏明刚, 杨彦裕, 陈琳, 费梅, 程宗琦, 张玲, 毛叶勤, 熊佩华*, 缪丽燕
(苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006)

[摘要] 目的:利用单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)肾病模型研究芪归益肾方通过调控细胞信号通路 TGF- β /Smad/ILK 的表达水平影响肾脏纤维化进展的程度。方法:昆明种小鼠 32 只,随机分为正常组、模型组、贝那普利组和芪归益肾方组,每组 8 只,除正常组外,其余各组制备 UUO 肾病模型后分别进行药物干预,第 10 天处死后取肾组织,分别采用苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肾组织的病理变化,免疫组化观察小鼠肾组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),细胞信号转导分子 2(Smad2), I 型胶原(Col-I)和整合素连接激酶(ILK)蛋白的表达,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测小鼠肾组织 TGF- β_1 , Col-I 和 ILK mRNA 及蛋白的表达情况。结果:与正常组比较,免疫组化结果显示模型组小鼠肾组织 TGF- β_1 , Smad2, Col-I, ILK 蛋白表达量明显升高,RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示小鼠肾组织 TGF- β_1 , Col-I 和 ILK mRNA 及蛋白表达明显升高($P < 0.05$),模型组小鼠肾脏纤维化程度较为明显;与模型组比较,贝那普利组和芪归益肾方组治疗后肾脏纤维化程度均有减轻,明显降低小鼠肾组织 TGF- β_1 , Smad2, Col-I, ILK 蛋白表达,明显降低小鼠肾组织 TGF- β_1 , Col-I 和 ILK mRNA 及蛋白的表达($P < 0.05$),其中芪归益肾方治疗组比较贝那普利组效果更为明显($P < 0.05$)。结论:芪归益肾方对于 UUO 肾病模型的纤维化病变程度具有抑制作用,其作用主要与调控细胞信号通路 TGF- β /Smad/ILK 表达相关。

[关键词] 芪归益肾方; 单侧输尿管梗阻肾病; 肾脏纤维化; 细胞信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0090-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200090

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160830.0817.028.html>

[网络出版时间] 2016-08-30 8:17

Anti-Fibrosis Effect of Qigui Yishen Formula in Kidney of Mice with Unilateral Ureteral Obstruction

WEI Ming-gang, YANG Yan-yu, CHEN Lin, FEI Mei, CHENG Zong-qi, ZHANG Ling,
MAO Ye-qin, XIONG Pei-hua*, MIAO Li-yan
(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Qigui Yishen formula (QGYS) on delaying the renal fibrosis by regulating the expression of cell signaling pathway TGF- β /Smad/ILK in unilateral ureteral obstruction (UUO) nephropathy models. **Method:** The 32 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, benazepril group, and QGYS group, $n = 8$ in each group. All the mice except those in normal group were used to prepare UUO nephropathy models. Corresponding drugs were used in various groups then. Renal tissues were taken after sacrificing on day 10 and were used for HE staining to observe the pathological changes of renal tissues in mice; immunohistochemistry was used to observe transforming growth factor-1 (TGF- β_1) of renal tissues, cell signal transduction molecules-2 (Smad2), type I collagen (Col-I) and integrin linked kinase (ILK) protein

[收稿日期] 20151024(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273723,81473633);江苏省中医药管理局项目(LZ13235);江苏省第二批老中医药专家学术经验继承工作项目;苏州市科技局应用基础研究项目(5YS201602)

[第一作者] 魏明刚,博士,副教授,从事中西医结合肾脏病基础与临床工作, Tel:0512-67780318, E-mail:weiminggang@suda.edu.cn

[通讯作者] *熊佩华,主任医师,从事中西医结合肾脏病基础与临床工作, Tel:0512-67780318, E-mail:weimg@sina.com

expressions; RT-PCR and Western blot were used to observe the mRNA and protein expression levels of TGF- β_1 , Col-I and ILK. **Result:** As compared with the normal group, immunohistochemistry results showed that the protein expression levels of TGF- β_1 , Smad2, Col-I and ILK were significantly increased in renal tissues of model group mice; RT-PCR and Western blot results showed that the mRNA and protein expression levels of TGF- β_1 , Col-I and ILK were significantly increased in renal tissues of model group mice ($P < 0.05$), with more obvious renal fibrosis. As compared with the model group, renal fibrosis was relieved in benazepril group, and QGYS group; protein expression levels of TGF- β_1 , Smad2, Col-I and ILK were significantly reduced ($P < 0.05$), and the effect in QGYS group was more obvious in that of benazepril group ($P < 0.05$). **Conclusion:** QGYS could decrease the level of renal fibrosis in UO nephropathy models, and the action mechanism may be associated with regulating the expression of the cell signaling pathway of TGF- β /Smad/ILK.

[**Key words**] Qigui Yishen formula; unilateral ureteral obstruction nephropathy; renal fibrosis; cell signaling pathway

肾脏纤维化是所有慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 发展至终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 的共同通路。其主要病理改变为正常肾单位丢失, 取而代之以细胞外基质的堆积导致肾小球硬化、大量成纤维细胞及肌成纤维细胞增生导致肾小管间质纤维化, 最终引起肾脏功能逐渐丧失^[1]。肾脏纤维化的病理过程与病变的发展密切相关。在此过程中很多细胞因子和炎症介质都直接或间接地参与了这一过程。芪归益肾方源自课题组以往研究的方剂“加味当归补血汤”, 方剂来源于《内外伤辨惑论》中经典名方“当归补血汤”加味化裁而来, 方剂制定基于课题组对于 CKD 病因病机的认识而制定^[2-3]。

课题组结合国内外的研究进展和前期研究基础, 创新性地提出以整合素连接激酶 (integrin-link kinase, ILK) 为代表的细胞间黏附因子在肾脏纤维化病变中的作用和地位值得关注^[4-6]。基于 ILK 的细胞信号通路转化生长因子- β (TGF- β)/细胞信号转导分子 (Smad)/ILK 在肾脏纤维化进展中发挥核心的调控作用, 进而认为该细胞信号通路的调控可能是中医药延缓肾脏纤维化病变进展的主要作用靶点。

1 材料

1.1 动物 SFP 级健康雄性 KM 小鼠, 体重 18 ~ 20 g, 由昭衍 (苏州) 新药研究有限公司提供, 合格证号 SCXK (苏) 2013-0003。

1.2 药物及试剂 黄芪、当归等药物购自苏州市天灵中药饮片有限公司, 由苏州大学附属第一医院制剂室程宗琦主任药师鉴定分别为豆植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* 的干燥根, 伞形科植物当归

Angelica sinensis 的干燥根。盐酸贝那普利片 (北京诺华制药有限公司, 批号 x2556)。芪归益肾方制备: 将黄芪、当归等药物按照一定的比例制备成混悬液, 混悬液按照生药计算质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 药物制备在苏州大学附属第一医院制剂室完成。逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号 A3500), dNTPs, MgCl_2 , Taq PCR 聚合酶及 PCR DL2000 Marker (日本 TaKaRa 公司, 批号分别为 CBF4901A, AB401A, DR100AM, D501A); 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 及三羟甲基氨基甲烷 (Tris-base) (美国 Amresco 公司, 批号分别为 E174, D0194); TGF- β_1 , Smad2, I 型胶原 (Col-I) 和 ILK 一抗 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab-53169, ab-33875, ab-34710, ab-52480)。

1.3 仪器 Hybaid Express 型 PCR 扩增仪 (美国 Thermo 公司), SW-CJ-1F 型超净工作台 (苏州净化公司), Imager 2000 凝胶图象系统 (美国 Alpha 公司), 灰度分析使用 Image J 灰度分析软件 (美国 NIH 公司)。

2 方法

2.1 模型的制备及分组^[7] 将 32 只小鼠适应性饲养 1 周, 普通饮食, 自由进水, 1 周后开始实验。根据随机数字表法随机分为假手术组、模型组、贝那普利组和芪归益肾方组。各组在 2% 戊巴比妥麻醉下行左侧输尿管结扎术。小鼠在固定器上固定后, 腹部消毒, 沿腹正中线切开皮肤, 剪开腹膜, 暴露左侧肾脏及输尿管, 游离输尿管后以 5~0 号手术线做结扎, 生理盐水冲洗后关腹并逐层缝合腹膜及皮肤, 制成单侧输尿管梗阻 (UUO) 模型, 假手术组仅以手术线穿过输尿管, 余步骤与手术组相同。术后第 2 日开始 ig。

2.2 给药方法 按照临床患者的常规剂量与小鼠用药的换算关系,确定小鼠 *ig* 的中剂量。然后按照 0.5~2 倍的剂量确定高、中、低 3 个剂量组进行预实验,结合研究结果确定最终使用剂量 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[8];贝那普利使用剂量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;假手术组、模型组均按体重 *ig* 生理盐水。以开始 *ig* 记为实验第 1 天,第 10 天将小鼠颈椎脱臼处死,快速剖取左肾,分别进行病理及分子生物学检测。实验动物的所有程序由苏州大学伦理学委员会批准。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 光镜观察肾组织的病理变化 小鼠脱颈椎处死后,迅速取出肾组织,并在新鲜配置的 10% 的福尔马林溶液中进行固定处理,石蜡包埋切片厚度 $2 \mu\text{m}$,行苏木素-伊红 (HE) 染色。光镜下观察肾组织的病理变化。对肾小管间质病变进行半定量评分,肾小管间质病变指数评分根据病变范围及严重程度,分别以 0,1,2,3 分代表正常、轻度、中度和重度。肾小管间质病变指数包括间质单核细胞浸润、间质纤维化及肾小管萎缩^[9]。

2.3.2 免疫组织化学检测 肾组织切片冷丙酮固定、水洗、磷酸盐缓冲液 (PBS) 液洗、加入一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,PBS 液洗,加入二抗,PBS 液洗,DAB 显色,镜下控制、水洗,苏木素衬染、水洗、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、封固后观察。观察方法:棕色或者棕褐色着色面积作为阳性面积。应用计算机医学病理图象分析系统对肾脏组织切片的免疫组织化学染色的结果进行分析,在 200 倍光学显微镜下每个组织切片采集 10 个不重叠视野中的阳性染色面积,然后计算每个视野内的染色区域的平均积分吸光度 *IA*,然后将数据汇总。

2.3.3 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测肾脏组织 TGF- β_1 , Col- I 和 ILK mRNA 和蛋白表达 肾组织蛋白 TGF- β_1 , Col- I 和 ILK 的引物序列是根据网上 NCBI 数据库中各自基因序列设计获得,由上海康成生物技术有限公司合成,见表 1。RT-PCR 实验具体操作参见课题组已经发表的相关文献^[10]。RT-PCR 检测 TGF- β_1 , Col- I 和 ILK mRNA 表达,取各组小鼠肾组织采用一步法抽提总 RNA,分光光度法测 RNA 含量与纯度后,在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境中保存。使用试剂盒进行逆转录 cDNA。TGF- β_1 , Col- I, ILK 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 引物由上海康成生物技术有限公司合成。凝胶图象系统对凝胶进行拍照并使用积分吸光度 *IA* 分析法进行数据分析,以 β -actin 作为内参,并与 β -actin 对照,数值以 *IA* 比值

表示。实验结果重复 3 次。Western blot 检测肾皮质 TGF- β_1 , Col- I 和 ILK 蛋白表达,取各组小鼠肾皮质,用含蛋白酶抑制剂的组织裂解液在研磨器中研磨,离心取上清液即为总蛋白。进行凝胶电泳湿转仪湿转至硝酸纤维素膜。脱脂奶室温封闭 1 h 并加一抗过夜。然后加羊抗兔 IgG 室温反应 2 h,在 X 射线片上曝光,显影、定影、冲洗晾干后扫描蛋白条带。以 β -actin 为内参,采用灰度分析法进行数据分析。

表 1 TGF- β_1 , Col- I 和 ILK 的引物序列

Table 1 Primer sequences of TGF- β_1 , Col- I and ILK

基因	引物序列	产物长度/bp
TGF- β_1	上游 5'-CTCCGGGCTGCGGCTGCAGC-3'	136
	下游 5'-CCGCTCGATGCGCTTCGCTTCA-3'	
Col- I	上游 5'-CGCTACTACCGGGCTGATGAT-3'	321
	下游 5'-GTCCTTGGGGTCTTGTCTGATGTA-3'	
ILK	上游 5'-ATGCCGCCATCGTTACAC-3'	285
	下游 5'-CGACGTTAGCCTCGTTCTCA-3'	
β -actin	上游 5'-CTCCATCTGGCCTCGCTGT-3'	268
	下游 5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3'	

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理,各组数据均数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,相关分析采用 Pearson 相关,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 UUO 小鼠肾脏系膜基质及肾脏小管间质病变的影响 各组小鼠肾脏系膜基质指数[肾小球基质面积 (*Ms*)/肾小球面积 (*Gs*) 和肾脏小管间质病变指数变化比较]。模型组系膜基质指数及肾小管间质病变指数均明显高于正常组 ($P < 0.05$);但芪归益肾方组与贝那普利组均不同程度的使系膜基质的增生程度有一定的减轻,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),从而减少肾脏细胞外基质增加,延缓肾脏纤维化的速度。见表 2。

表 2 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾脏系膜基质及肾脏小管间质病变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Qigui Yishen formula on kidney mesangial matrix and renal tubule interstitial lesions in UUO mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	系膜基质指数	肾小管-间质指数
正常	-	0.251 ± 0.067	3.06 ± 0.85
模型	-	$0.472 \pm 0.083^{1)}$	$9.06 \pm 0.93^{1)}$
贝那普利	1×10^{-3}	$0.382 \pm 0.091^{2)}$	$7.41 \pm 0.82^{2)}$
芪归益肾方	30	$0.295 \pm 0.061^{2,3)}$	$4.96 \pm 1.02^{2,3)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与贝那普利组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3,4 同)。

3.2 对 UUO 小鼠肾脏组织 TGF-β₁, Smad2, Col-I 及 ILK 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肾小球中 TGF-β₁, Smad2, Col-I 及 ILK 蛋白表达比正常组明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,贝那普利组

和芪归益肾方组与模型组比较 TGF-β₁, Smad2, Col-I 及 ILK 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); 与贝那普利组比较,芪归益肾方组各蛋白降低明显 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 1 ~ 4。

表 3 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾脏组织 TGF-β₁, Smad2, Col-I 及 ILK 蛋白表达 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Qigui Yishen formula on expression of TGF-β₁, Smad2, Col-I and ILK protein IA in kidney tissue of UUO mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁	Smad2	Col- I	ILK
正常	-	0.298 ± 0.071	0.277 ± 0.056	0.274 ± 0.065	0.219 ± 0.044
模型	-	0.496 ± 0.067 ¹⁾	0.501 ± 0.059 ¹⁾	0.457 ± 0.046 ¹⁾	0.323 ± 0.035 ¹⁾
贝那普利	1 × 10 ⁻³	0.366 ± 0.041 ²⁾	0.372 ± 0.049 ²⁾	0.362 ± 0.029 ²⁾	0.302 ± 0.033 ²⁾
芪归益肾方	30	0.313 ± 0.051 ^{2,3)}	0.322 ± 0.058 ^{2,3)}	0.314 ± 0.027 ^{2,3)}	0.291 ± 0.029 ^{2,3)}

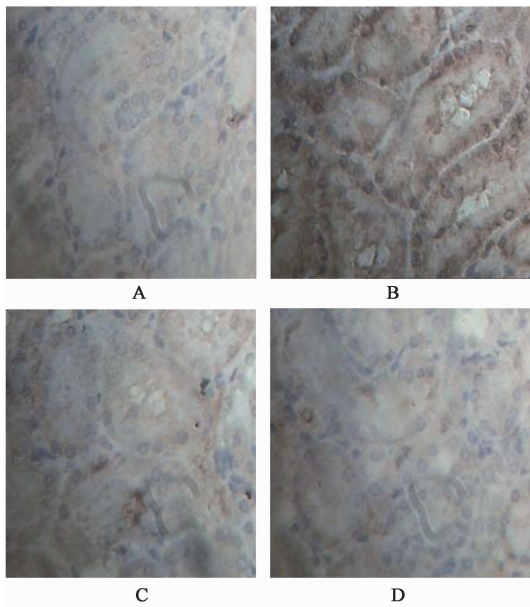


图 1 各组小鼠肾组织 TGF-β₁ 的表达 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Expression of TGF-β₁ in renal tissue of each mice (IHC, ×400)

Fig. 1 Expression of TGF-β₁ in renal tissue of each mice (IHC, ×400)

3.3 对小鼠肾脏组织 TGF-β₁, Col-I 和 ILK mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 TGF-β₁, Col-I 和 ILK 的蛋白和 mRNA 的表达均明显的升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,应用芪归益肾方组与贝那普利组干预后可以部分下调 TGF-β₁, Col-I 和 ILK 的蛋白和 mRNA 的表达量 ($P < 0.05$)。从上述的结果可以间接反映出芪归益肾方延缓 UUO 小鼠肾脏纤维化进展的可能机制与调控细胞信号通路 TGF-β/Smad/ILK 表达相关。见表 4, 图 5, 6。

4 讨论

肾脏纤维化的主要病理改变为正常肾单位的丢

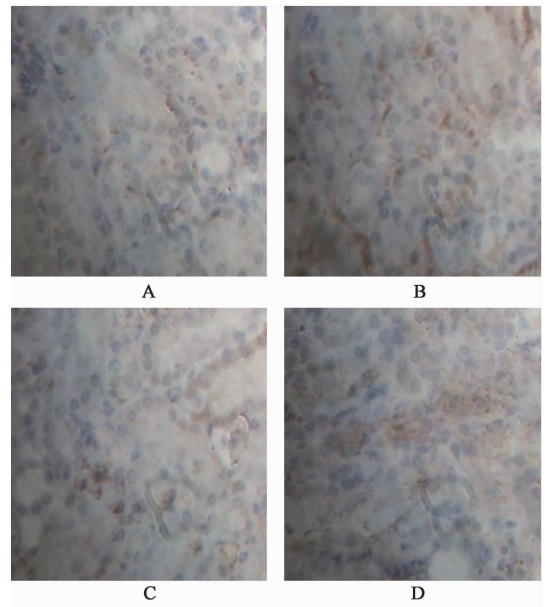


图 2 各组小鼠肾组织 Smad2 的表达 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Expression of Smad2 in renal tissue of each mice (IHC, ×400)

失,取而代之以大量成纤维细胞及肌成纤维细胞的增生导致 ECM 的堆积,肾小管间质纤维化以及肾小球硬化,肾功能逐渐丧失^[11]。众所周知 TGF-β₁ 是一种强致纤维化因子^[12]。因此, TGF-β₁ 在组织中表达水平一定程度上决定了组织纤维化的程度。ILK 是一种丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶, ILK 是处于 TGF-β₁/Smad 下游的重要效应物并在在跨膜信号传导中起着重要作用^[13]。研究发现 TGF-β₁ 以时间和剂量依赖的方式诱导 ILK 在肾小管上皮细胞的表达,这种作用依赖于 Smad 信号转导。另外 ILK 的重要作用是在 CKD 病变过程中诱导肾组织的 MMP-2 的表达,进而导致肾小管基底膜破坏,促进了小管上皮细胞在基质之中的迁移和入侵^[14-16],

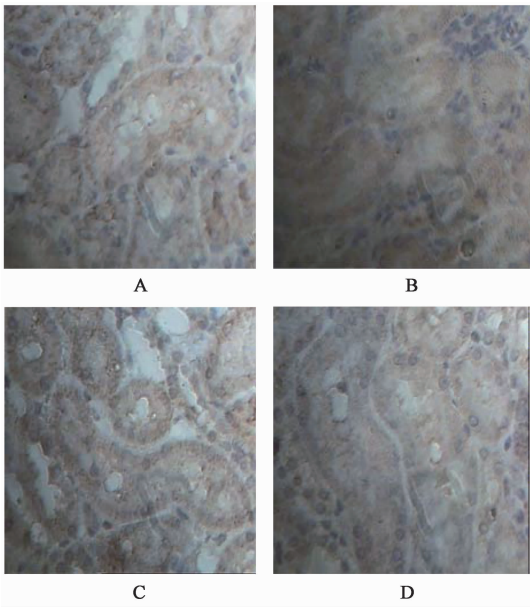


图 3 各组小鼠肾脏组织 Col-1 的表达(免疫组化, ×400)
Fig. 3 Expression of Col-1 in renal tissue of each mice(IHC, ×400)

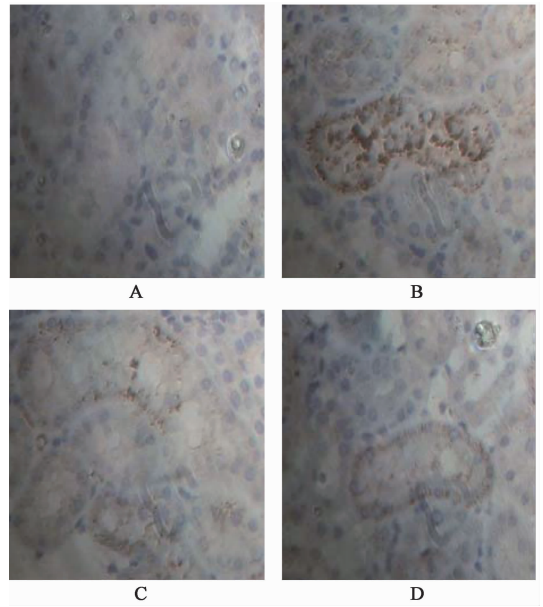


图 4 各组小鼠肾脏组织 ILK 的表达(免疫组化, ×400)
Fig. 4 Expression of ILK in renal tissue of each mice(IHC, ×400)

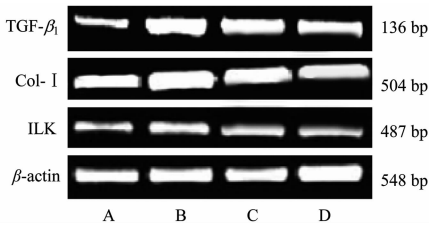


图 5 各组小鼠肾脏组织 TGF-β₁, Col-1 和 ILK mRNA 的表达
Fig. 5 Expression of TGF-β₁, Col-1 and ILK mRNA in kidney tissue of each mice

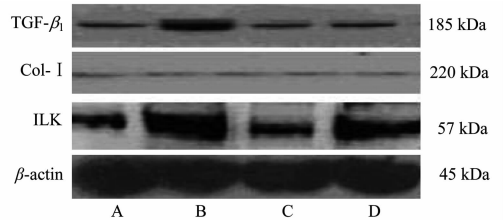


图 6 各组小鼠肾脏组织 TGF-β₁, Col-1 和 ILK 蛋白的表达
Fig. 6 Expression of TGF-β₁, Col-1 and ILK protein in kidney tissue of each mice

表 4 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾脏组织 TGF-β₁, Col-1 和 ILK 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Qigui Yishen formula on expression of TGF-β₁, Col-1 and ILK in kidney tissue of UUO mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	mRNA			蛋白		
		TGF-β ₁ /β-actin	Col-1/β-actin	ILK/β-actin	TGF-β ₁ /β-actin	Col-1/β-actin	ILK/β-actin
正常	-	0.199 ± 0.022	0.219 ± 0.016	0.237 ± 0.060	0.285 ± 0.033	0.232 ± 0.039	0.297 ± 0.035
模型	-	0.386 ± 0.025 ¹⁾	0.423 ± 0.021 ¹⁾	0.401 ± 0.045 ¹⁾	0.457 ± 0.029 ¹⁾	0.474 ± 0.033 ¹⁾	0.404 ± 0.029 ¹⁾
贝那普利	1 × 10 ⁻³	0.353 ± 0.027 ²⁾	0.374 ± 0.019 ²⁾	0.345 ± 0.049 ²⁾	0.361 ± 0.029 ²⁾	0.364 ± 0.041 ²⁾	0.315 ± 0.028 ²⁾
芪归益肾方	30	0.289 ± 0.023 ^{2,3)}	0.317 ± 0.018 ^{2,3)}	0.298 ± 0.057 ^{2,3)}	0.326 ± 0.028 ^{2,3)}	0.287 ± 0.042 ^{2,3)}	0.355 ± 0.028 ^{2,3)}

从而对肾小管间质纤维化起到明显的协同作用。对于 ECM 代谢而言,在调控 TGF-β₁ 的基础上有望通过直接对其下游信号通路的 ILK 干预发挥作用。基于此笔者认为抑制 ILK 表达水平对肾脏纤维化疾病有潜在治疗价值。

UUO 肾病模型是肾小管间质纤维化的典型动物模型之一,肾小管间质纤维化是指在各种致病因子的作用下肾脏的间质细胞及细胞间质增多,尤其是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白合成

增加、降解受抑制而引起 ECM 的大量堆积导致肾小管间质的纤维化。从本研究的实验结果来看,芪归益肾方可以减轻肾脏系膜基质增生和肾小管间质的病变程度。模型组小鼠 TGF-β₁, Smad2, Col-1 和 ILK 表达水平增加明显,上述因素均参与肾间质纤维化的进程且它们之间具有比较明显的线性相关性,病变特点与相关研究具有一致性^[10]。通过应用芪归益肾方和贝那普利药物干预的 UUO 模型小鼠的肾脏纤维化程度均具有不同程度的减轻,应用芪

归益肾方治疗后的 UUO 模型小鼠减轻的程度优于贝那普利组。进一步应用分子生物学的研究方法从基因和蛋白水平证实了芪归益肾方在延缓肾脏纤维化进展的治疗机制与细胞因子和黏附因子的调控密切相关。通过本研究证实,芪归益肾方具有减轻 ECM 增生的程度和下调 TGF- β_1 和 ILK 表达,从而具有抑制肾脏纤维化的作用。

芪归益肾方源自课题组以往研究的方剂“加味当归补血汤”,方剂来源基于《内外伤辨惑论》中经典名方“当归补血汤”加味化裁而来。对于肾小管间质纤维化病变而言,肾脏病变过程中出现的小管上皮细胞病变和纤维细胞活化等病理改变。这种病理现象符合中医理论脾肾两虚、瘀血阻络的特点。根据上述病因病机笔者制定了芪归益肾方。其中,芡实、金樱子益肾健脾是为君药,黄芪、太子参、白术重在健脾益气是为臣药,当归、川芎、牛膝活血通络,白花蛇舌草清利下焦,蝉蜕搜风通络共为佐药,甘草调和诸药、牛膝益肾通络又引药入肾经同为使药,全方针对 CKD 病变之病因病机针对性制定达到治疗目的。

本研究的结果证实,以“健脾益肾、活血通络”为治疗原则的中药方剂“芪归益肾方”可以减少 UUO 肾病小鼠组织中 TGF- β_1 和 ILK 表达水平,减轻 ECM 增生的程度,从而减轻肾脏小管间质损害达到延缓肾脏纤维化病变的进程。提示笔者通过对纤维化相关的细胞因子和黏附因子的调节作用防治肾脏纤维化的认识是正确的。该研究将中药的基础研究与药理学研究相互结合证实中药方剂的有效性,为进一步寻找治疗肾脏纤维化的中药作用物质基础和治疗靶点奠定基础。

[参考文献]

[1] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:799.
[2] 魏明刚,周栋,高坤,等. 肾脏病的基本病机探讨和益肾清利和络泻浊法应用的分析[J]. 辽宁中医,2010, 37(4):642-644.
[3] 魏明刚. 肾脏病病机的理论探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(11):1188-1191.

[4] 魏明刚. 整合素在慢性肾小球肾炎病变中的作用及中医理论探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(6):755-757.
[5] 陆迅,魏明刚. 黄芪多糖对肾间质纤维化大鼠的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2014,29(6):1998-2001.
[6] 魏明刚,孙伟,何伟明,等. 加味当归补血汤抗肾脏纤维化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2014, 20(7):904-908.
[7] 杨彦裕,魏明刚,程宗琦,等. 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾脏组织 TGF- β_1 /Smad/PI3K 影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(6):89-93.
[8] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:356-357.
[9] Sun D, Wang L C. Effect of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction [J]. Life Sci, 2012, 14(23):900-902.
[10] Wei M G, Sun W, Xiong P H, et al. Antifibrotic effect of the Chinese herbs modified Danggui Buxue decoction on adriamycin-induced nephropathy in rats [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(8):591-598.
[11] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibro-genesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1):1-12.
[12] Fan J M, Ng Y Y, Hill P A, et al. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro* [J]. Kidney Int, 1999, 56(4):1455-1467.
[13] 杜菲,黄常志. 整合素相关激酶研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册,2001,23(3):142-145.
[14] 赵建辉,何红权,陈洪宇. 整合素连接激酶与肾间质纤维化[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2011,12(1): 88-91.
[15] Yan Q, Sui W G, Xie S Y, et al. Expression and role of integrin-linked kinase and collagen IV in human renal allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy [J]. Transplant Immunology, 2010, 23(1/2):1-5.
[16] 李锋. 肾间质纤维化发生机制的研究进展[J]. 中国医药指南, 2011, 9(35):287-289.

[责任编辑 周冰冰]