

# 苦碟子注射液对输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响

林云, 曹灵\*

(西南医科大学附属医院, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** **目的:**研究苦碟子注射液(简称苦碟子)对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的作用及机制。**方法:**采用单侧输尿管结扎法制备大鼠肾间质纤维化模型,随机分为正常组、假手术组、模型组、缬沙坦( $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、苦碟子低、高剂量( $0.15, 0.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组。各组大鼠在给药后第7,14天分批处死,采集血液、肾组织,测定血清肌酐(serum creatinine, SCr),尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)含量;肾组织匀浆检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性;肾脏苏木素-伊红(HE),马松(Masson)染色观察肾脏病理变化;免疫组化法检测各组大鼠肾组织转化生长因子- $\beta_1$ (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ),磷酸化-Smad2/3(phosphorylated Smad2/3, p-Smad2/3),骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)的表达,并行半定量分析;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肾组织 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, BMP-7及I型胶原(Col I)mRNA表达。**结果:**苦碟子能降低肾间质纤维化大鼠血肌酐水平,能减轻肾间质小管损伤,减少肾间质胶原相对面积,MDA含量,下调 TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, Col I的表达;增加 SOD的活性以及 BMP-7表达水平,与苦碟子低剂量组比较,以苦碟子高剂量( $0.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组效果最为显著( $P < 0.05$ )。**结论:**苦碟子对大鼠肾间质纤维化的保护作用,可能与其降低大鼠肾组织氧化应激水平、抑制 TGF- $\beta_1$ /Smad/BMP-7信号通路传导,从而抑制细胞外基质增生有关。

**[关键词]** 苦碟子注射液; 肾间质纤维化; 氧化应激; 转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )/Smad/骨形成蛋白-7(BMP-7)信号通路

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289.5;R277.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0139-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180795

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.1010.032.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-13 16:43

## Effect of Kudiezi Injection on Renal Interstitial Fibrosis of Rats with Unilateral Ureteral Obstruction

LIN Yun, CAO Ling\*

(Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Kudiezi injection on renal tubulointerstitial fibrosis and the possible mechanisms. **Method:** Unilateral ureteral ligation was used to establish renal interstitial fibrosis models, and the Sprague-dawley rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, valsartan ( $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) group, Kudiezi low and high ( $0.15, 0.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) dose groups. At 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day after the administration, the rats were sacrificed for blood samples and renal tissues. Serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were measured for renal function. Malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were measured to reflect renal oxidative stress levels. Hematoxylin eosin (HE) and Masson staining were used to visualize renal fibrosis in each group. Immunohistochemical analysis was used to detect the expression of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), phosphorylated-Smad2/3 (p-Smad2/3),

**[收稿日期]** 20171015(014)

**[基金项目]** 四川省卫生厅科研项目(120342);泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2017LZXNYD-J13)

**[第一作者]** 林云,在读硕士,医师,从事肾小球疾病与肾脏纤维化防治的实验研究, Tel:18715798869, E-mail:1462342987@qq.com

**[通信作者]** \*曹灵,硕士生导师,主任医师,从事肾小球疾病与肾脏纤维化防治的实验研究, Tel:0830-3165341, E-mail:lzcaoling@163.com

and bone morphogenetic protein-7 (BMP-7). The expression levels of TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, BMP-7 and type I collagen (Col I) mRNA in renal tissue were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Kudiezi could decrease the level of serum creatinine in renal interstitial fibrosis rats, alleviate tubulointerstitial damage, reduce the relative area of renal interstitial collagen, down-regulate the content of MDA and the expression of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, Col I, and up-regulate the activity of SOD and the expression of BMP-7. As compared with Kudiezi low dose group, Kudiezi high dose ( $0.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group showed better effect and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The protective effect of Kudiezi on renal interstitial fibrosis in rats might be related to the reduction of oxidative stress level and inhibition of TGF- $\beta_1$ /Smad/BMP-7 signaling pathway, thereby inhibiting the proliferation of extracellular matrix.

**[Key words]** Kudiezi injection; renal interstitial fibrosis; oxidative stress; transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )/Smad/bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) signaling pathway

肾间质纤维化是多种慢性肾脏病进展至终末期肾病(尿毒症)的共同病理表现,积极延缓或阻止其进展具有重要意义。肾间质纤维化发病机制错综复杂,涉及细胞因子、信号通路、氧化应激等,目前研究较多的通路有转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad 通路, Wnt 信号通路,细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路,磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/mTOR 通路等。研究发现 TGF- $\beta_1$ /Smad/骨形成蛋白-7(BMP-7)信号通路也是介导纤维化疾病的信号通路<sup>[1]</sup>。大量的数据表明 BMP-7 与糖尿病肾病、缺血再灌注肾损伤、急性肾损伤的发生密切相关<sup>[2-3]</sup>。在梗阻性肾病中,BMP-7 表达减少与肾小管结构损伤、肾单位数量减少、严重的肾间质纤维化以及肾功的降低密切相关<sup>[4]</sup>,可见阻断 BMP-7 信号通路将会延缓肾间质纤维化的进展。

目前有关肾间质纤维化的治疗尚无公认有效药物,中药在肾间质纤维化疾病的防治方面有一定优势,但研究多集中在中药复方制剂上,而缺乏对单味中药深入系统的研究。苦碟子注射液以菊科草本植物苦碟子 *Ixeris sonchifolia* 为原料提取精制而成的静脉注射液,是临床治疗心脑血管疾病常用的活血化瘀单味中药制剂,具有抗炎、抗氧化、降糖、调脂等药理作用<sup>[5]</sup>。研究发现苦碟子对大鼠和猪肝纤维化均有一定的延缓作用<sup>[5-6]</sup>;在缺血所致的心脏损害中,苦碟子可通过抗氧化作用保护心肌细胞免受损伤<sup>[7]</sup>。目前有关苦碟子对肾间质纤维化的研究尚未见报道,因此,本研究以氧化应激,TGF- $\beta_1$ /Smad/BMP-7 信号通路为研究靶点,探讨苦碟子是否具有抗肾间质纤维化作用及可能的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 无特定病原体级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量( $180 \pm 20$ )g,购自成都达硕实验动物有

限公司,合格证号 SCXK(川)2015-0030。动物实验的开展取得了西南医科大学实验动物伦理委员会批准(编号 20170100006)。

**1.2 药物** 苦碟子注射液(沈阳双鼎制药有限公司,批号 Z20025449,20 mL/支,相当于原生药  $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );缙沙坦胶囊(湖南千金湘江药业股份有限公司,批号 H20103521,80 mg/片),据给药量用生理盐水稀释成  $0.008 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**1.3 试剂** 丙二醛(MDA),总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150117,20151202);TGF- $\beta_1$  抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab92486);p-Smad2/3 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-8853R);BMP-7 抗体(美国 Bioworld 公司,批号 bs3674);trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 10296010);逆转录试剂盒(上海东洋纺生物科技有限公司,批号 FSK-100);PCR 试剂盒及引物合成(北京擎科新业生物技术有限公司,批号 TSE005)。

**1.4 仪器** 7020 型日立全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司),Evolution 200 型紫外分光光度计(芬兰 Therm 公司),RM2235 型轮式切片机(德国 Leica 公司),B-3048 型 PCR 仪(杭州博日科技有限公司),JY300E 型凝胶电泳仪、转模仪(北京君意东方电泳设备有限公司),GelDoc XR<sup>+</sup> 型全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模和分组** 健康雄性 SD 大鼠 60 只,适应性喂养 1 周后,随机分成正常组(10 只),假手术组(10 只),单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction,UUO)组(40 只)。大鼠经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠( $0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉,右侧卧位固定于鼠板上,消毒皮肤,暴露并分离左侧输尿管,4-0 缝合

线在左输尿管上中1/3处双重结扎并离断输尿管,分层缝合关闭腹腔<sup>[8]</sup>。假手术组只分离输尿管,余操作同梗阻组,正常组不做任何处理。造模成功后将梗阻组随机分成模型组,缬沙坦组,苦碟子低、高剂量组,每组10只。

**2.2 给药** 按人用药剂量的6.3倍换算为大鼠的等效用药剂量,所有大鼠于术后第1天开始给药,缬沙坦组每天以0.01 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,苦碟子低、高剂量组每天分别以0.15,0.30 g·kg<sup>-1</sup>腹腔注射,模型组、正常组、假手术组每天以1 mL·kg<sup>-1</sup>腹腔注射生理盐水,连续给药14 d。

**2.3 肾功能的测定** 在给药后第7,14天,各组大鼠随机取5只麻醉后,心脏采血并分离血清,-80℃保存,留取肾组织,应用全自动生化分析仪测定血清肌酐及尿素氮的含量。

**2.4 比色法检测肾组织中MDA,SOD水平** 取大鼠肾脏组织约50 mg,经玻璃匀浆器研磨后,按试剂盒说明处理样品,紫外分光光度计测定肾组织MDA,SOD吸光度A。

**2.5 肾病理学检查** 肾组织常规石蜡包埋后行苏木素-伊红(HE)染色,每张切片在400倍显微镜下观察肾间质小管损伤情况,随机选取10个视野(下同),参照文献<sup>[9]</sup>方法按下列指标进行肾间质损伤指数评分:肾小管上皮细胞空泡样变性、扩张、萎缩、及间质水肿、纤维化以及各种管型等,并计算其均值。马松(Masson)染色观察肾间质胶原纤维相对面积,镜检观察肾间质胶原阳性染色面积占整个视野比率,参照文献<sup>[10]</sup>方法按如下标准评分:0分(无阳性染色),1分(<25%),2分(25%~50%),3分(50%~75%),4分(>75%)。

**2.6 肾组织免疫组化染色及量化** 采用EnVision II检测肾组织中TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3, BMP-7的表达。取石蜡切片依次进行脱蜡复水,柠檬酸钠或EDTA抗原修复,3%过氧化氢封闭过氧化氢酶,一抗孵育(TGF-β<sub>1</sub> 1:200, p-Smad2/3 1:400, BMP-7 1:100),4℃过夜,滴加生物素化的二抗,DAB显色,苏木素复染,镜检。阳性结果判定:TGF-β<sub>1</sub>, BMP-7以肾小管上皮细胞胞浆内棕褐色颗粒为阳性, p-Smad2/3以肾小管上皮细胞胞核或胞浆内棕褐色颗粒为阳性。蛋白表达的量化:①TGF-β<sub>1</sub>, BMP-7参照文献<sup>[10]</sup>的方法,利用Image Pro Plus6.0计算免疫组化阳性染色肾小管或间质所占视野的比率,半定量评分后取均值。②p-Smad2/3参照文献<sup>[11]</sup>方法,计算每个视野阳性细胞及总细胞数,折算成每

200个总细胞数中的阳性细胞数进行分析,以细胞数多少反应蛋白表达量。

**2.7 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肾脏组织中TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, BMP-7, I型胶原(Col I), mRNA表达** 取肾脏组织100 mg,液氮研磨,trizol试剂提取肾组织总RNA并逆转录为cDNA(条件为30℃,10 min,43℃,1 h,85℃,2 min,10℃保存),以cDNA为模板进行目的基因扩增(条件为预变性98℃,2 min,变性98℃,10 s,退火60℃,10 s,延伸72℃,10 s,延伸72℃,2 min,4℃保存),30~35个循环后取PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳(电压120 V,时间约20 min),凝胶成像仪扫描,IMAGE J软件分析条带灰度值,计算目的基因与内参β-actin比值,作为目的基因mRNA相对表达量,实验重复3次,引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成,序列见表1。

表1 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, BMP-7, Col I和β-actin的引物序列  
Table 1 Primers of TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, BMP-7, Col I and β-actin

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp
TGF-β <sub>1</sub>	上游 CCGCAACAACGCAATCTATG	579
	下游 CAACCCAGGTCCTCTCTAAAG	
Smad2	上游 AACTGTCTCTACCACTCTCTC	120
	下游 CTCCAACCCTCTGGTTTAGTTC	
Smad3	上游 GCCTCAGTGACAGTGCTATTT	249
	下游 TCACCTGTCTGTCTCTGTACTC	
BMP-7	上游 CGCTCCAAGACTCCAAAGAA	987
	下游 TGCAGCCTCAGGAAGAAATAG	
Col I	上游 GGGCAAGACAGTCATCGAATA	148
	下游 GATTGGGATGGAGGGAGTTTAC	
β-actin	上游 GTGTGGATTGTTGGCTCTATC	122
	下游 CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	

**2.8 统计学分析** 数据处理采用SPSS 19.0统计分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用Least-Significant-Difference(LSD)检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 苦碟子注射液对大鼠肾功能的影响** 与正常组、假手术组比较,模型组血肌酐水平明显增加,经苦碟子注射液、缬沙坦干预后可降低模型组大鼠血肌酐水平(P<0.05)。各组大鼠间血尿素氮水平差异,无统计学意义。见表2。

表 2 苦碟子注射液对大鼠肾功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Kudiezi injection on rat of kidney function( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	时间 /d	BUN /mmol·L <sup>-1</sup>	SCr /μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	7	5.14 ± 0.67	31.98 ± 1.25
		14	5.23 ± 1.09	36.58 ± 0.25
假手术	-	7	4.98 ± 0.52	32.03 ± 0.93
		14	5.53 ± 0.48	39.37 ± 0.77
模型	-	7	5.48 ± 0.72	53.13 ± 1.73 <sup>1)</sup>
		14	6.11 ± 0.83	78.75 ± 3.01 <sup>1)</sup>
缬沙坦	0.01	7	5.28 ± 1.02	42.35 ± 2.36 <sup>2)</sup>
		14	6.25 ± 0.94	59.38 ± 7.52 <sup>2)</sup>
苦碟子注射液	0.15	7	5.24 ± 1.30	47.75 ± 3.62 <sup>2)</sup>
		14	6.29 ± 0.15	63.66 ± 1.66 <sup>2)</sup>
	0.30	7	5.89 ± 2.06	45.38 ± 1.49 <sup>2)</sup>
		14	6.81 ± 1.07	60.42 ± 5.67 <sup>2)</sup>

注:与正常组、假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 苦碟子注射液对大鼠肾组织 MDA, SOD 的影响** 与正常组、假手术组比较,模型组肾组织 MDA 含量显著升高, SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,苦碟子注射液组、缬沙坦组肾组织中 MDA 含量明显降低, SOD 活性有所增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而苦碟子注射液高、低剂量组间有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**3.3 苦碟子注射液对大鼠肾脏组织病理学改变的影响** 在整个实验期间,正常组、假手术组大鼠肾小球、肾小管形态结构正常、排列紧密、肾间质所占比例较少,无炎性细胞浸润,偶见肾小管上皮细胞空泡样变性。在第 7 天,模型组大鼠出现肾小管上皮细胞肿胀、空泡样变性、管腔扩张与萎缩并存、肾间质水肿、炎细胞浸润、间质胶原沉积;第 14 天模型组肾间质纤维化加重,可见大量的纤维基质增生,病灶内大部分肾小管萎缩、消失;肾间质损伤指数、胶原纤维相对面积显著高于正常组、假手术组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。经药物干预后肾小管上皮细胞及间质病变程度较模型组减轻,肾间质损伤指数、胶原纤维相对面积低于模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且苦碟子注射液各剂量组间有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 2, 表 4。

**3.4 苦碟子注射液对大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3, BMP-7 蛋白的影响** 与正常组、假手术组比较,模型组大鼠 TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3 的表达均显著

表 3 苦碟子注射液对大鼠肾组织氧化应激指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Kudiezi injection on oxidative stress in rat kidney tissue( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	时间 /d	MDA /μmol·g <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	7	1.72 ± 0.59	162.83 ± 1.95
		14	1.51 ± 0.73	169.43 ± 0.65
假手术	-	7	1.58 ± 0.35	158.92 ± 0.97
		14	1.63 ± 0.25	172.31 ± 1.59
模型	-	7	3.58 ± 0.67 <sup>1)</sup>	106.93 ± 2.61 <sup>1)</sup>
		14	4.23 ± 0.29 <sup>1)</sup>	93.27 ± 0.79 <sup>1)</sup>
缬沙坦	0.01	7	2.43 ± 0.19 <sup>2)</sup>	131.20 ± 2.51 <sup>3)</sup>
		14	2.78 ± 0.31 <sup>3)</sup>	145.96 ± 0.65 <sup>3)</sup>
苦碟子注射液	0.15	7	3.21 ± 0.45 <sup>2)</sup>	119.68 ± 3.62 <sup>2)</sup>
		14	3.68 ± 0.16 <sup>2)</sup>	127.93 ± 0.78 <sup>3)</sup>
	0.30	7	2.65 ± 0.34 <sup>2,4)</sup>	128.61 ± 0.15 <sup>3,4)</sup>
		14	2.92 ± 0.29 <sup>3,4)</sup>	137.92 ± 1.89 <sup>3,4)</sup>

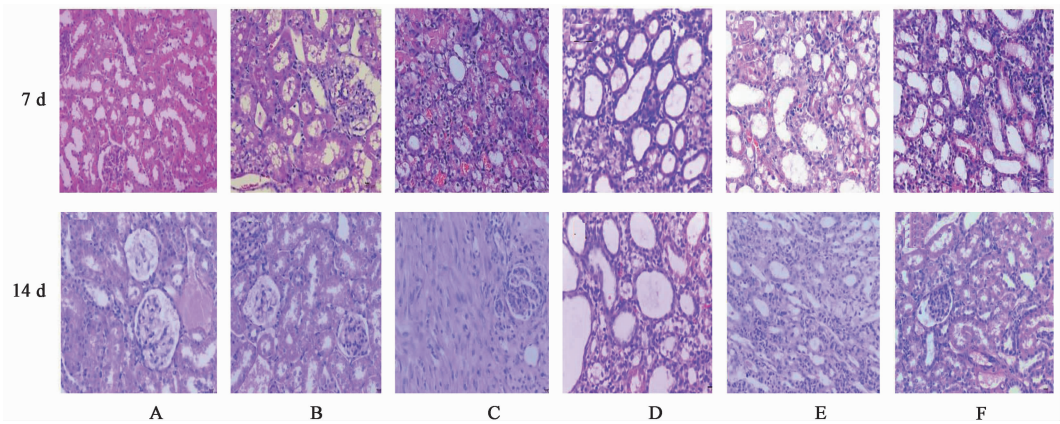
注:与正常组、假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05, ^3) P < 0.01$ ;与苦碟子注射液低剂量组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$  (表 4 ~ 6 同)。

表 4 苦碟子注射液对大鼠肾间质损伤指数、胶原相对面积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Kudiezi injection on renal interstitial damage index and relative area of collagen in rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	时间/d	肾间质损伤指数	胶原相对面积
正常	-	7	0.78 ± 0.51	0.20 ± 0.42
		14	0.69 ± 0.74	0.10 ± 0.32
假手术	-	7	0.77 ± 0.32	0.30 ± 0.48
		14	0.79 ± 0.43	0.20 ± 0.42
模型	-	7	7.82 ± 0.93 <sup>1)</sup>	1.90 ± 0.74 <sup>1)</sup>
		14	15.78 ± 0.62 <sup>1)</sup>	3.40 ± 0.84 <sup>1)</sup>
缬沙坦	0.01	7	4.16 ± 1.78 <sup>3)</sup>	0.80 ± 0.42 <sup>3)</sup>
		14	7.39 ± 0.53 <sup>3)</sup>	1.50 ± 0.53 <sup>3)</sup>
苦碟子注射液	0.15	7	6.23 ± 1.06 <sup>2)</sup>	1.40 ± 0.52 <sup>2)</sup>
		14	11.14 ± 2.32 <sup>2)</sup>	2.70 ± 0.48 <sup>2)</sup>
	0.30	7	5.69 ± 1.67 <sup>3,4)</sup>	0.70 ± 0.32 <sup>3,4)</sup>
		14	8.81 ± 0.85 <sup>3,4)</sup>	1.90 ± 0.74 <sup>3,4)</sup>

升高, BMP-7 的表达均显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,经苦碟子注射液、缬沙坦治疗后 TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3 的表达显著降低, BMP-7 的表达明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3 降低程度, BMP-7 升高程度在苦碟子注射液高、低剂量组间存在差异 ( $P < 0.05$ )。见表 5。图 3 ~ 5。



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 缬沙坦组; E. 苦碟子注射液低剂量组; F. 苦碟子注射液高剂量组(图 2~6 同)

图 1 苦碟子注射液对大鼠肾间质损伤改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Kudiezi injection on changes of renal interstitial injury in rats(HE, ×400)

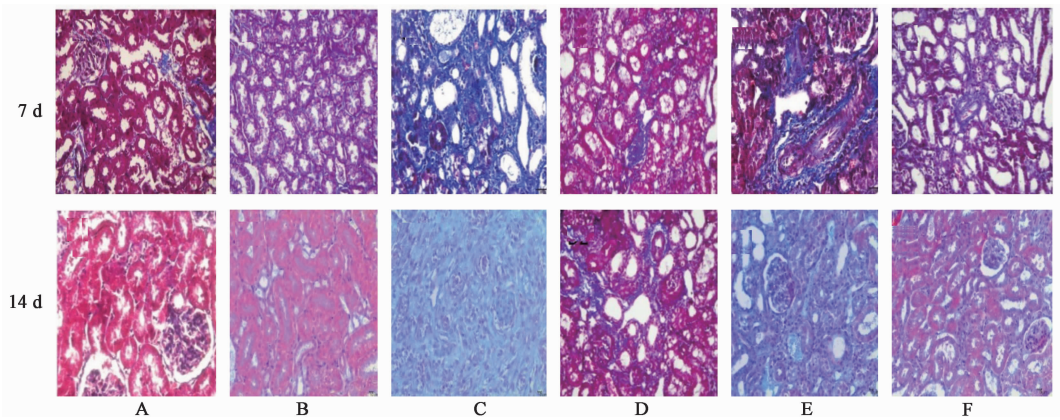


图 2 苦碟子注射液对大鼠肾间质胶原相对面积的影响(Masson, ×400)

Fig. 2 Effect of Kudiezi injection on relative area of collagen in renal interstitium of rats(Masson, ×400)

表 5 苦碟子注射液对大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3, BMP-7 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of Kudiezi injection on TGF-β<sub>1</sub>, p-Smad2/3, BMP-7 in renal tissue of rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	时间/d	TGF-β <sub>1</sub>	p-Smad2/3	BMP-7
正常	-	7	0.70 ± 0.48	1.87 ± 0.47	4.10 ± 0.74
		14	0.90 ± 0.57	35.32 ± 2.89	3.90 ± 0.57
假手术	-	7	0.80 ± 0.42	1.48 ± 0.43	4.40 ± 0.70
		14	0.80 ± 0.53	31.20 ± 3.10	4.20 ± 0.63
模型	-	7	3.50 ± 0.85 <sup>1)</sup>	33.25 ± 5.13 <sup>1)</sup>	1.50 ± 0.71 <sup>1)</sup>
		14	3.90 ± 0.32 <sup>1)</sup>	94.30 ± 14.33 <sup>1)</sup>	0.90 ± 0.57 <sup>1)</sup>
缬沙坦	0.01	7	1.50 ± 0.71 <sup>2)</sup>	6.14 ± 1.63 <sup>3)</sup>	3.70 ± 0.66 <sup>3)</sup>
		14	2.10 ± 0.88 <sup>3)</sup>	43.06 ± 0.45 <sup>3)</sup>	3.60 ± 0.69 <sup>3)</sup>
苦碟子注射液	0.15	7	2.50 ± 0.53 <sup>3)</sup>	16.60 ± 2.40 <sup>3)</sup>	2.50 ± 0.85 <sup>2)</sup>
		14	3.20 ± 0.57 <sup>3)</sup>	67.21 ± 12.01 <sup>3)</sup>	2.60 ± 0.97 <sup>3)</sup>
	0.30	7	1.90 ± 0.57 <sup>2,4)</sup>	8.79 ± 3.29 <sup>3,4)</sup>	3.40 ± 0.52 <sup>2,4)</sup>
		14	2.20 ± 1.03 <sup>3,4)</sup>	48.08 ± 9.10 <sup>3,4)</sup>	3.40 ± 0.84 <sup>2,4)</sup>

3.5 苦碟子注射液对大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, BMP-7, Col I mRNA 的影响 在模型组中 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, Col I mRNA 的表达水平较正常组、假手术组显著增加, BMP-7 mRNA 表达水平

明显降低( $P < 0.01$ )。经苦碟子注射液与缬沙坦干预后 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, Col I (mRNA 表达明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ), BMP-7 mRNA 表达明显增加( $P < 0.05$ ), 且苦碟子注射液高低剂量组间

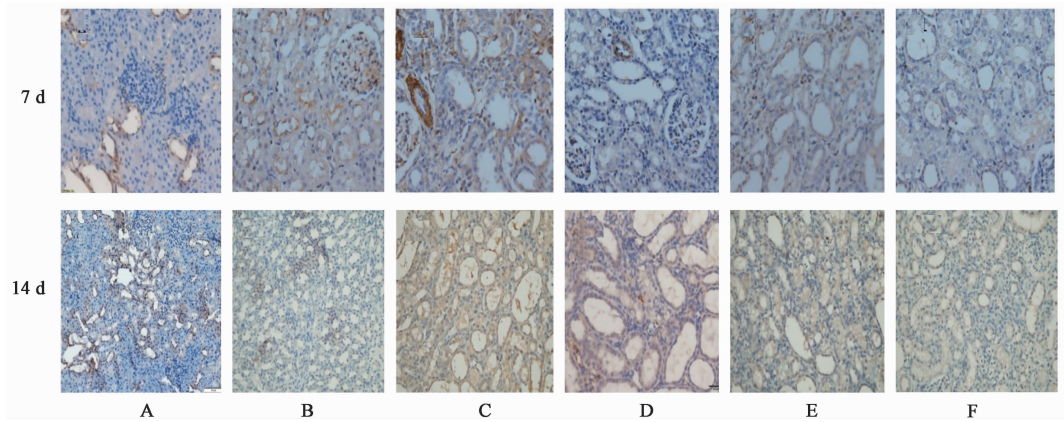


图 3 苦碟子注射液对大鼠 TGF- $\beta_1$  表达水平的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 3 Effect of Kudiezi injection on expression level of TGF- $\beta_1$  in rats (IHC,  $\times 400$ )

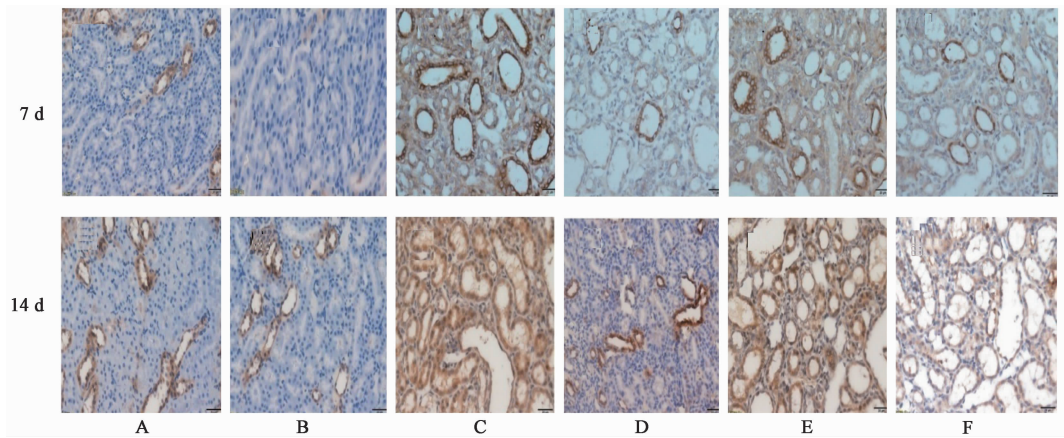


图 4 苦碟子注射液对大鼠 p-Smad2/3 表达水平的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 4 Effect of Kudiezi injection on expression level of p-Smad2/3 in rats(IHC,  $\times 400$ )

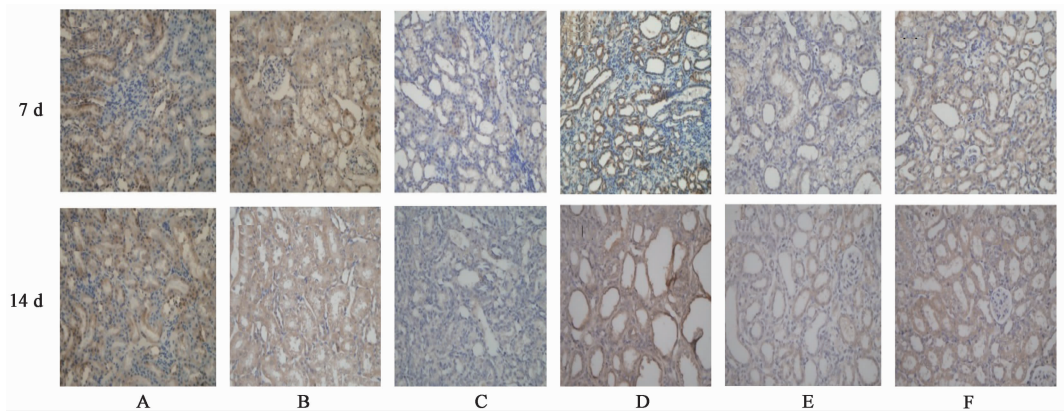


图 5 苦碟子注射液对大鼠 BMP-7 表达水平的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 5 Effect of Kudiezi injection on expression level of BMP-7 in rats(IHC,  $\times 400$ )

存在差异。见图 6,表 6。

#### 4 讨论

肾间质纤维化是以肾小管萎缩和(或)扩张、炎症细胞浸润及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度积聚为特征的病理改变,是各种肾脏疾病进展至终末期肾衰竭的表现。采用单侧输尿管梗

阻制备大鼠肾间质纤维化动物模型是国际公认的做法。现代研究表明苦碟子注射液含有腺苷、黄酮、阿魏酸等成分<sup>[12]</sup>,药理作用广泛;它能抑制成纤维细胞增殖,对大鼠肝纤维化具有防治作用<sup>[2]</sup>;苦碟子联合沙坦类药物可显著减少糖尿病肾病患者的蛋白尿以及尿液中促纤维化因子 TGF- $\beta_1$ , 结缔组织生长

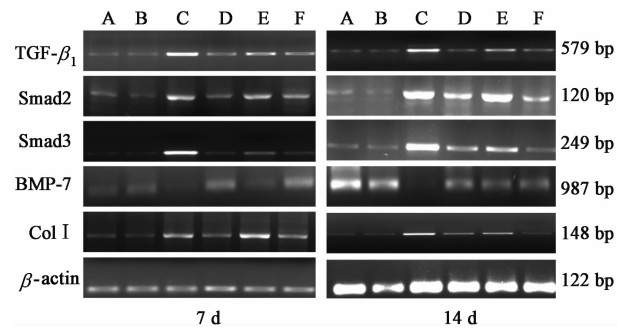


图 6 苦碟子注射液对大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, BMP-7, Col I mRNA 的影响

Fig. 6 Effect of Kudiezi injection on TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, BMP-7 and Col I mRNA in renal tissue of rats

表 6 苦碟子注射液对大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, BMP-7, Col I mRNA 吸光度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of Kudiezi injection on absorbance of TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, BMP-7 and Col I mRNA in renal tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	时间/d	TGF- $\beta_1$	Smad2	Smad3	BMP-7	Col I
正常	-	7	0.80 ± 0.10	1.09 ± 0.07	0.57 ± 0.05	1.15 ± 0.09	0.63 ± 0.05
		14	1.07 ± 0.15	1.13 ± 0.04	1.08 ± 0.09	3.13 ± 0.11	1.12 ± 0.17
假手术	-	7	0.93 ± 0.15	1.03 ± 0.07	0.51 ± 0.03	1.28 ± 0.06	0.85 ± 0.70
		14	0.97 ± 0.21	1.02 ± 0.05	1.07 ± 0.05	2.84 ± 0.07	1.09 ± 0.21
模型	-	7	6.82 ± 0.56 <sup>1)</sup>	5.33 ± 0.11 <sup>1)</sup>	6.09 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.25 ± 0.12 <sup>1)</sup>	7.17 ± 0.35 <sup>1)</sup>
		14	6.17 ± 0.70 <sup>1)</sup>	6.94 ± 0.12 <sup>1)</sup>	6.59 ± 0.22 <sup>1)</sup>	0.14 ± 0.04 <sup>1)</sup>	6.53 ± 0.34 <sup>1)</sup>
缬沙坦	0.01	7	2.53 ± 0.35 <sup>3)</sup>	2.51 ± 0.17 <sup>3)</sup>	1.90 ± 0.17 <sup>3)</sup>	1.77 ± 0.13 <sup>3)</sup>	2.16 ± 0.29 <sup>3)</sup>
		14	2.81 ± 0.70 <sup>3)</sup>	3.62 ± 0.32 <sup>3)</sup>	3.01 ± 0.21 <sup>3)</sup>	1.95 ± 0.07 <sup>3)</sup>	2.95 ± 0.14 <sup>3)</sup>
苦碟子注射液	0.15	7	4.26 ± 0.57 <sup>3)</sup>	4.22 ± 0.12 <sup>2)</sup>	3.96 ± 0.11 <sup>3)</sup>	0.44 ± 0.07 <sup>3)</sup>	3.98 ± 0.29 <sup>3)</sup>
		14	4.73 ± 0.78 <sup>2)</sup>	6.61 ± 0.13	4.28 ± 0.21 <sup>3)</sup>	1.53 ± 0.17 <sup>3)</sup>	5.03 ± 0.20 <sup>2)</sup>
	0.30	7	2.33 ± 0.25 <sup>3,4)</sup>	3.12 ± 0.06 <sup>3,4)</sup>	2.05 ± 0.08 <sup>3,4)</sup>	1.83 ± 0.09 <sup>3,4)</sup>	2.03 ± 0.11 <sup>3,4)</sup>
		14	2.84 ± 0.35 <sup>3,4)</sup>	4.18 ± 0.20 <sup>3,4)</sup>	2.19 ± 0.19 <sup>3,4)</sup>	1.86 ± 0.09 <sup>3)</sup>	3.17 ± 0.20 <sup>3,4)</sup>

与肾缺血、低氧、活性氧产物有关<sup>[13]</sup>；此外，在缺血再灌注和顺铂所致的肾损伤中，发现肾组织中反应氧化应激水平的指标均有所增加<sup>[14-15]</sup>。本实验也发现随着造模时间的延长，模型组肾脏病理损伤逐渐加重，肾组织中氧化应激产物 MDA 含量也逐渐增加、而抗氧化的 SOD 活性逐渐降低，与文献报道类似，表明在 UUO 模型存在中氧化应激反应的增加，提示氧化应激可能在 UUO 模型肾间质纤维化中起着重要作用。经苦碟子治疗后可显著降低 MDA 含量，增加 SOD 活性，这与苦碟子中阿魏酸、黄酮等抗氧化物质的作用有关。

TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路是目前已知的促进肾间质纤维化发生最关键的信号通路，病理状态下过度激活可刺激 ECM 蛋白的产生，降低 ECM 降解蛋白质的活性，促进肾小球硬化和间质纤维化的发生<sup>[16]</sup>。BMP-7 可介导 Smad 细胞间信号传导，激活

因子 (CTGF)，血管紧张素 II (Ang II) 的含量，从而延缓糖尿病肾病的进展。本研究通过建立大鼠肾间质纤维化模型，发现模型组大鼠血肌酐水平较正常组、假手术组明显升高，经苦碟子干预后可降低血肌酐，改善肾功能，推测与苦碟子中活血化瘀成分腺苷的作用有关。通过肾脏组织病理学发现，苦碟子可使反映肾间质纤维化的金指标肾间质损伤指数、胶原沉积面积显著降低，提示具有其抗纤维化作用，且高剂量组与缬沙坦作用相当，表明苦碟子能在一定程度可减轻大鼠肾间质纤维化的发生进展。

氧化应激是导致细胞损伤、衰老和死亡的主要原因之一。研究表明，在 UUO 模型中肾脏病理损伤

特殊基因而发挥抗肾纤维化的作用。临床研究表明在慢性移植肾病所致的肾纤维化中，BMP-7 表达减少是导致其发生纤维化的因素之一<sup>[17]</sup>。Tuğlular 等<sup>[18]</sup>发现环孢素 A 诱导的肾毒性也与肾脏 BMP-7 表达减少有关。在多种急慢性肾损伤模型中都明确提示 BMP-7 可通过阻止炎症和纤维化，改善肾间质 TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, 细胞外基质蛋白 I 型胶原及相关基因的表达在 UUO 术后进行性增加；BMP-7 表达进行性减少，提示 TGF- $\beta_1$ /Smad/BMP-7 信号通路可能参与肾间质纤维化的发展，苦碟子干预后减慢了这一病理过程，从而延缓肾脏病变的加重，与上述报道相符，表明苦碟子可能是通过影响 TGF- $\beta_1$ /Smad/BMP-7 信号的传导而发挥抗纤维化作用。

近年来中药注射剂的安全性受到质疑。崔瑞昭等<sup>[19]</sup>对 18 072 例使用苦碟子注射液的患者进行不良反应的 Meta 分析，发现苦碟子最常见的不良反应

为头晕、头昏、头胀及头痛等中枢及外周神经系统损害,停药或对症处理后上述症状消失,发生率仅为2.9%。张兆康等<sup>[20]</sup>收集了24 225例使用苦碟子注射液和14 191例未使用苦碟子注射液患者的住院资料,通过倾向性评分法平衡混杂因素,采用Logistic回归分析苦碟子对患者肾功能的影响,结果显示两组间血肌酐、尿素氮水平无显著性差异。因此,他们认为基于现有数据,未发现苦碟子注射液对患者肾功能有损害,苦碟子注射液总体安全性可接受。

综上所述,通过肾组织病理学观察的方法并联合检测肾组织氧化应激指标, TGF- $\beta_1$ /Smad/BMP-7信号通路相关蛋白及基因,探讨了苦碟子对大鼠肾间质纤维化的影响,结果表明该药具有抗肾间质纤维化的作用,因此有望成为临床上防治肾间质纤维化药物,但其抗纤维化具体作用机制有待深入研究。

#### [参考文献]

[1] CHEN B L, PENG J, LI Q F, et al. Exogenous bone morphogenetic protein-7 reduces hepatic fibrosis in schistosoma japonicum-infected mice *via* transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(9):1405-1415.

[2] Ivanac J R, Corić M, Furić Č V, et al. Bmp-7 protein expression is downregulated in human diabetic nephropathy [J]. Acta Clin Croat, 2015, 54(2):164-168.

[3] Kamiura N, Hirahashi J, Matsuzaki Y, et al. Basic helix-loop-helix transcriptional factor myoD regulates BMP-7 in acute kidney injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 304(9):F1159-F1166.

[4] Manson S R, SONG J B, GUO Q, et al. Cell type specific changes in BMP-7 expression contribute to the progression of kidney disease in patients with obstructive uropathy [J]. J Urol, 2015, 193(5):1860-1869.

[5] 张志勇, 罗安明, 刘艳菊, 等. 苦碟子注射液对大鼠肝纤维化模型肝脏 MMP-1、TIMP-1 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(32):4113-4115.

[6] 赵菊花, 吴曙光, 巫全, 等. 苦碟子注射液治疗贵州小型猪肝纤维化的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3):586-588.

[7] LIU X, TAO Y, WANG F, et al. Kudiezi injection mitigates myocardial injury induced by acute cerebral ischemia in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):8-18.

[8] XIAO X, DU C, YAN Z, et al. Inhibition of necroptosis attenuates kidney inflammation and interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction [J]. Am J Nephrol, 2017, 46(2):131-138.

[9] Radford M G, Donadio J V, Bergstralh E J, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(2):199-207.

[10] LIN S L, CHEN R H, CHEN Y M, et al. Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4 activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(9):2702-2713.

[11] XIN J, GU Y, CHEN J, et al. Renoprotective effect of endothelin receptor antagonist bosentan and its possible mechanism [J]. Chi J Nephrol, 2002, 18(2):107-110.

[12] 黄秋明, 左祖俊. 苦碟子注射液的临床应用 [J]. 中国药房, 2008, 19(33):2631-2633.

[13] LIANG J, TIAN S, HAN J, et al. Resveratrol as a therapeutic agent for renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction [J]. Ren Fail, 2014, 36(2):285-291.

[14] ZHOU S, SUN Y, ZHUANG Y, et al. Effects of kallistatin on oxidative stress and inflammation on renal ischemia reperfusion injury in mice [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(2):265-273.

[15] Valentovic M A, Ball J G, Brown J M, et al. Resveratrol attenuates cisplatin renal cortical cytotoxicity by modifying oxidativestress [J]. Toxicol In Vitro, 2014, 28(2):248-257.

[16] MENG X M, Nikolic P D, LAN H Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6):325-338.

[17] SU J, YIN L P, ZHANG X, et al. Chronic allograft nephropathy in rats is improved by the intervention of rhein [J]. Transplant Proc, 2013, 45(6):2546-2552.

[18] Tuğlular S, Gogas Y D, Cakalağaoğlu F, et al. Cyclosporine-A induced nephrotoxicity is associated with decreased renal bone morphogenetic protein-7 expression in rats [J]. Transplant Proc, 2004, 36(1):131-133.

[19] 崔瑞昭, 谢雁鸣, 廖星, 等. 苦碟子注射液用药安全性的系统评价 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12):2380-2390.

[20] 张兆康, 杨薇, 刘崮, 等. 基于倾向性评分的苦碟子注射液对肾功能影响的临床实效研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13):2661-2667.

[责任编辑 邹晓翠]