

· 药理 ·

## 肾衰泄浊汤及其补虚、祛邪组分对UUO大鼠 肾间质纤维化的影响

晏子友<sup>1</sup>, 江坚青<sup>2</sup>, 罗富里<sup>1\*</sup>, 皮持衡<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330000; 2. 江西中医药大学, 南昌 330000)

**[摘要]** 目的:研究肾衰泄浊汤及其补虚、祛邪组分对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾间质纤维化的影响。方法:通过结扎单侧输尿管建立UUO大鼠模型。SD大鼠随机分为6组,分别为假手术组,模型组,贝那普利组,肾衰泄浊汤组,补虚方组,祛邪方组;每组24只。手术后第3天,肾衰泄浊汤组,补虚方组,祛邪方组大鼠均按 $0.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肾衰泄浊汤浓缩剂给药,即给药剂量为 $8.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 体质量灌胃;贝那普利组大鼠给贝那普利 $1.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 体质量灌胃,假手术组,模型组大鼠给等量生理盐水灌胃。术后第7,14,21天,分别用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肾组织中周细胞及相关信号通路标志物表达情况。结果:与模型组比较,肾衰泄浊汤组,补虚方组,祛邪方组在UUO后第14,21天的间质损伤评分和间质胶原的积累均显著降低( $P<0.05$ )。除假手术组外,各组在第14,21天的肾组织中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),血小板衍生生长因子A(PDGFA),神经/胶质细胞2型硫酸软骨素糖蛋白(NG-2),血管内皮生长因子A(VEGFA),血管内皮生长因子受体1(VEGFR1),血小板源性生长因子 $\beta$ (PDGF- $\beta$ ),血小板源性生长因子受体 $\beta$ (PDGFR- $\beta$ )的蛋白表达均较第7天显著增加( $P<0.05$ )。在手术后第21天,肾衰泄浊汤组的肾组织中NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGFR- $\beta$ 蛋白表达均显著低于模型组( $P<0.05$ )。与模型组比较,肾衰泄浊汤组在手术后第21天的肾组织中 $\alpha$ -SMA, PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$  mRNA相对表达量均显著降低( $P<0.05$ ),并且肾衰泄浊汤组在手术后第21天 $\alpha$ -SMA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGFR- $\beta$  mRNA相对表达量显著低于贝那普利组( $P<0.05$ )。结论:肾衰泄浊汤复方及其补虚、祛邪组分对UUO大鼠肾间质纤维化均具有拮抗作用,其作用机制与抑制周细胞及其相关细胞信号通路激活有关。

**[关键词]** 肾衰泄浊汤; 血管周细胞; 单侧输尿管梗阻; 肾间质纤维化

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0071-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201504

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200508.0856.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-5-8 10:44

### Effect of Shenshuai Xiezhuo Decoction and Its Deficiency Tonifying and Pathogen Eliminating Components on Renal Interstitial Fibrosis in UUO rats

YAN Zi-you<sup>1</sup>, JIANG Jian-qing<sup>2</sup>, LUO Fu-li<sup>1\*</sup>, PI Chi-heng<sup>1</sup>

(1. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China;  
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Shenshuai Xiezhuo decoction and its deficiency tonifying and pathogen eliminating components on renal interstitial fibrosis in UUO rats. **Method:** A rat model of unilateral ureteral obstruction (UUO) was established through ligation of a unilateral ureter. The rats were divided into six groups: sham operation group, model group, benazepril group, Shenshuai Xiezhuo decoction group, Buxufang group, and phlegm group, with 24 rats in each group. On the third day after operation, the

**[收稿日期]** 20191120(022)

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区基金项目(81660769)

**[第一作者]** 晏子友, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事肾纤维化研究, E-mail: 13970025368@163.com

**[通信作者]** \* 罗富里, 硕士, 主治医师, 从事慢性肾脏病心血管疾病研究, E-mail: 372861629@qq.com

rats in the Shenshuai Xiezhuo decoction group, Buxufang group, and phlegm group were given Shenshuai Xiezhuo decoction concentrating agent at a dose of  $8.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , the rats in the benazepril group were given benazepril  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , and the rats in the sham operation group and the model group were given the same volume of saline. On the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after operation, the expressions of peripheral cells and relevant signal pathway markers in renal tissue were detected by Western blot and Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) respectively. **Result:** The stromal damage score and the interstitial collagen accumulation on the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after UUO were significantly lower in the Shenshuai Xiezhuo decoction group, Buxu prescription group and Qixie prescription group than those in the model group ( $P < 0.05$ ). Except for the sham operation group, the protein expressions of  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), platelet derived growth factor A (PDGFA), nerve/glia type 2 chondroitin sulfate glycoprotein (NG-2), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1), platelet-derived growth factor- $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) and platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) in the kidney tissues of the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days were significantly increased compared with those on the 7<sup>th</sup> day ( $P < 0.05$ ). On the 21<sup>st</sup> day after surgery, the expressions of NG-2, VEGFA, VEGFR1 and PDGFR- $\beta$  in renal tissue of Shenshuai Xiezhuo decoction group were significantly lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, relevant expressions of  $\alpha$ -SMA, PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , and PDGFR- $\beta$  in kidney tissue of Shenshuai Xiezhuo decoction group decreased significantly on the 21<sup>st</sup> day after operation ( $P < 0.05$ ), and relative expressions of  $\alpha$ -SMA, NG-2, VEGFA, VEGFR1 and PDGFR- $\beta$  in the Shenshuai Xiezhuo decoction group were significantly lower than those in the benazepril group on the 21<sup>st</sup> day after surgery ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Shenshuai Xiezhuo decoction and its deficiency tonifying and pathogen eliminating components have an antagonistic effect on renal interstitial fibrosis in UUO rats. Its mechanism is related to the inhibition of activation of peripheral cells and relevant cell signaling pathways.

**[Key words]** Shenshuai Xiezhuo decoction; perivascular cells; unilateral ureteral obstruction; renal interstitial fibrosis

肾间质纤维化(RIF)是所有慢性肾脏疾病的最终病理过程,其特征是肌成纤维细胞的聚集和活化<sup>[1]</sup>。目前认为,肌成纤维细胞主要来源于间质固有纤维细胞的活化,血管周成纤维细胞和周细胞,骨髓来源干细胞的转分化<sup>[2]</sup>。其中,周细胞被称为壁细胞,与健康或病理性血管系统相关<sup>[3-4]</sup>。许多研究表明,周细胞具有祖细胞的特征,并具有分化成骨细胞,脂肪细胞和骨骼肌细胞的潜力<sup>[5-6]</sup>。此外,在病理条件下,周细胞也可以分化成肌成纤维细胞,促进肾纤维化的进展<sup>[7]</sup>。肾衰泄浊汤是江西中医药大学附属医院长期使用的抗慢性肾衰竭的临床经验方,其是根据RIF“微形癥积”中医病机学特点,紧抓“虚,湿,瘀,毒”四大病机研制的一种中药复方,课题组前期临床研究结果表明肾衰泄浊汤可明显降低慢性肾衰竭患者血清肌酐,尿素氮和纤维化指标如血清透明质酸,层黏连蛋白,IV型胶原,具有延缓慢性肾衰竭的作用<sup>[8-9]</sup>。关于肾衰泄浊汤抗RIF的作用机制尚不清楚,因此,本研究拟观察肾衰泄浊汤复方及其不同拆分组份是否通过对周细

胞及相关信号通路的调控达到抗RIF的作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 本研究采用4周龄雌性SD大鼠,体重80~90 g,由江西中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号SYXK(赣)2013-0085,进行实验,动物伦理编号HZNU-RAE-01293。在整个研究过程中,大鼠可以自由获得食物和水。

**1.2 药物及试剂** 肾衰泄浊汤组[生黄芪30 g,生大黄10 g(后下),丹参15 g,巴戟天10 g,蒲公英15 g,槐花10 g,生牡蛎30 g,共7味中药],补虚方组(生黄芪30 g,巴戟天10 g),祛邪方组[生大黄10 g(后下),丹参15 g,蒲公英15 g,槐花10 g,生牡蛎30 g],所有饮片均由江西中医药大学中药饮片厂钟玉兰副主任中药师鉴定后提供,常规方法水煎,浓缩成每含生药量 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,含生药量均相当成人剂量的10倍(各中药组及贝那普利大鼠给药均按照沈映君教授主编《中药药理学》中实验用药选择换算大鼠用药剂量,10倍于临床用药剂量折算为等效剂量),真空密封包装,每袋150 mL,4℃冰箱保

存。盐酸贝那普利(商品名:洛丁新)由北京诺华制药有限公司提供。RIPA裂解缓冲液,Bradford蛋白浓度测定试剂盒(北京普利莱生物科技有限公司,批号分别为20180595,20121205);trizol试剂(福州迈新生物开发公司,批号20170312);反转录试剂盒试剂盒,快速Evagreen Super Mix试剂盒(美国Bio-Rad公司,批号分别为20150513,20170926); $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),血小板衍生生长因子A(PDGFA),神经/胶质细胞2型硫酸软骨素糖蛋白(NG-2),血管内皮生长因子A(VEGFA),血管内皮生长因子受体1(VEGFR1),血小板源性生长因子 $\beta$ (PDGF- $\beta$ ),血小板源性生长因子受体 $\beta$ (PDGFR- $\beta$ ), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔抗鼠一抗,山羊抗兔偶联于辣根过氧化物酶二抗(福州迈新生物开发公司,批号均为20170915);马松(Masson),苏木素-伊红(HE)染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号分别为20120332,20132412)。

**1.3 仪器** CFX Connect型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪, VersaDoc Model 4000型凝胶成像系统, Bio-Rad基础型电源电泳仪, Trans-Blot型全能型快速转膜仪(美国Bio-Rad公司);SGO-HDP12X型测量显微镜(购自深视光谷光学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与造模** 144只SD雌性大鼠,适应1周后按体质量随机分为假手术组,模型组,贝那普利组,肾衰泄浊汤组,补虚方组,祛邪方组,每组24只。单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠模型建立<sup>[6]</sup>,大鼠全麻诱导后,在左侧切开并用4-0丝线结扎左输尿管近端和远端,进行UUO手术。假手术组大鼠采用相同的手术方式,但未结扎输尿管。

**2.2 动物给药** 手术后第3天,肾衰泄浊汤组,补虚方组,祛邪方组大鼠均按 $0.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肾衰泄浊汤浓缩剂给药,即给药剂量为 $8.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 体质量灌胃(相当于成人剂量的10倍);贝那普利组大鼠给贝那普利 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 体质量灌胃(相当于成人剂量的10倍),假手术组,模型组大鼠给等量生理盐水灌胃。各组大鼠分别于手术后第7,14,21天,即大鼠灌药第5,12,19天,各组大鼠分别给药后2h各处死8只,以弯头小止血钳腹主动脉取血后,立即将血液滴入含 $0.4\text{ mL}$  4% EDTA- $\text{Na}_2$ 抗凝管中, $250\times\text{g}$ 离心 $10\text{ min}$ ,分离血清,分别标记好后于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱

保存备用。

## 2.3 检测指标

**2.3.1 一般情况观察** 观察各组大鼠饮食,体质量,存活率,活动情况;计算左肾(术侧)湿重,肾脏器系数(肾湿重/体质量 $\times 100\%$ )。

**2.3.2 肾组织学检查** 于术后第7,14,21天取尿路标本后,取手术侧肾脏一部分组织标本经10%甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE染色评估UUO后的管状损伤。间质性损伤评分定义为坏死小管的数量为0,正常小管;1,少数的单个坏死小管;2,3~5个坏死小管簇;3,大量坏死。用Masson三色染色法检测纤维性皮质间质区。

**2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测**  $\alpha$ -SMA, PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$ 蛋白的表达 取肾组织 $150\text{ mg}$ 标本加入预冷的RIPA裂解缓冲液,冰浴超声 $30\sim 45\text{ min}$ , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $10\text{ min}$ 后吸取上清,采用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,将蛋白质加入到 $5\times$ 上样缓冲液中并在 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 下煮沸 $10\text{ min}$ 。通过SDS-PAGE分离等量的蛋白质并印迹到活化的聚偏二氟乙烯膜上。封闭后,将膜与一抗[ $\alpha$ -SMA(1:2 000), PDGFA(1:500), NG-2(1:1 000), VEGFA(1:200), VEGFR1(1:200), PDGF- $\beta$ (1:500), PDGFR- $\beta$ (1:500),  $\beta$ -actin(1:1 000)]在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 温育过夜。将印迹与偶联于辣根过氧化物酶的二抗温育 $1\text{ h}$ 。使用电化学发光(ECL)溶液进行曝光和显影,并使用凝胶成像系统进行拍照。以 $\beta$ -actin为内参照进行带灰度分析。将目标带与参考带的灰度比值作为蛋白质的相对表达,采用Image J 14.1软件进行图片处理。

**2.3.4 Real-time PCR检测**  $\alpha$ -SMA, PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$  mRNA表达 使用trizol试剂从一部分肾组织中提取总RNA,进行Real-time PCR分析。PCR反应条件设定为在 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 循环 $30\text{ s}$ 后,进行40个PCR循环,每个循环包括变性步骤( $95\text{ }^\circ\text{C}$   $5\text{ s}$ )和退火步骤( $60\text{ }^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ )。 $\beta$ -actin为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。引物由日本TaKaRa公司合成,引物序列见表1。

**2.4 统计学处理** 使用SPSS 23.0和GraphPad Prism 5软件进行统计分析,数据表示为 $\bar{x}\pm s$ (正态分布数据)或中位数带范围(非正态分布数据),采用独立或配对 $t$ 检验或单因素方差分析(ANOVA)估计每个变量的统计显著性, $P<0.05$ 为差异具有统

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 ACAGTGGCAAAGTGGAGATTC	140
	下游 GGCAGGATACTTTGCTGACT	
α-SMA	上游 TGTCCACCATGTGGCCTAA	178
	下游 GTCGAAATGAGGCTGTCTTTGA	
PDGFA	上游 ACCTCACCGAGGCCATTACAG	172
	下游 TAGGCCCGGCACATCCTAAC	
NG-2	上游 AGAATACTGGCCATCGATGG	166
	下游 GCTGAACGCATTCATCTCCT	
VEGFA	上游 GATCCTATGACCAGCGACTGTC	188
	下游 AGTAGCTTCCAATGCCACCAAAA	
VEGFR1	上游 CTCCTTGCCAGCCAAATGATAA	192
	下游 CCTCTTCATTCCAGTGGCAGTC	
PDGF-β	上游 CTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTA	221
	下游 CCCAAAGACCCACTCATTGCAGC	
PDGFR-β	上游 CAACCTGCTCAACCTGCCATCT	265
	下游 ATCCTGCCAGAGCGAAAAGC	

统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般情况观察结果** 模型组大鼠的皮毛松弛,暗淡,体瘦,厌食,懒动。治疗组大鼠的饮食,体质量,存活率,活动情况无显著差异,但整体状况均比模型组较好。假手术组 7, 14, 21 d 左肾肾脏器指数无明显变化,与假手术组比较,模型组 7, 14, 21 d 左肾脏器指数明显下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,各中药组和贝那普利组 14, 21 d 左肾脏器指数均明显升高( $P < 0.05$ ),肾衰泄浊汤组 21 d 左肾脏器指数明显高于其他 3 个治疗组( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.2 对 UUO 大鼠肾组织病理学变化的影响** HE 染色中,假手术组大鼠肾组织染色均匀,肾小管的大小,形态正常,肾间质未见明显的病理改变,肾间质内较少有炎性细胞浸润。模型组大鼠表现出广泛的肾结构损伤和形态改变,其特征是肾小管上皮萎缩,肾小管腔扩张,间质炎性细胞浸润和肾小管坏死。肾衰泄浊汤组,补虚方组和祛邪方组大鼠肾间质内有少量炎性细胞浸润及纤维组织增生,肾小管扩张程度较轻,肾小囊扩张,有 RIF 形成,但纤维化的面积较模型组小,仍保留着部分正常的肾小管结构,其中肾衰泄浊汤组的 RIF 程度最轻。与贝那普利组相比,肾衰泄浊汤组 RIF 程度较轻。见图 1。Masson 三色染色中,假手术组在光学显微镜下观

表2 肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组分对 UUO 大鼠侧肾肾脏器系数变的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

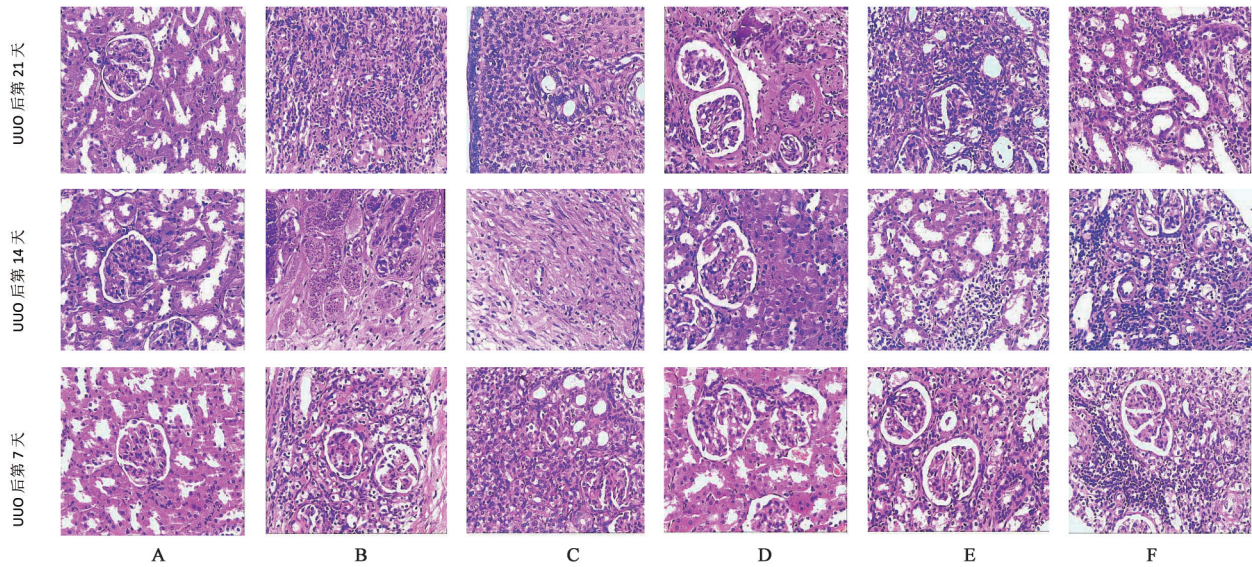
Table 2 Effect of Shenshuai Xiezhuo decoction and its components of tonifying deficiency and eliminating pathogenic components (SXTE) in each group on change of renal organ coefficient in UUO rats( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	t/d	体质量/g	左肾 质量/g	左肾脏器 系数/%
假手术	-	7	201.38±15.41	1.78±0.18	0.89±0.15
		14	218.22±15.50	2.22±0.17	1.02±0.09
		21	252.46±14.33	2.44±0.15	1.06±0.12
模型	-	7	217.62±11.53	1.26±0.10	0.57±0.07 <sup>1)</sup>
		14	226.31±20.13	1.49±0.07	0.59±0.04 <sup>1)</sup>
		21	239.56±17.21	1.31±0.12	0.51±0.18 <sup>1)</sup>
肾衰泄 浊汤	8	7	203.63±11.80	1.36±0.09	0.67±0.07
		14	219.53±18.74	2.02±0.15	0.93±0.14 <sup>2,3)</sup>
		21	245.56±17.46	2.38±0.14	0.99±0.13 <sup>2)</sup>
祛邪方	8	7	198.62±7.33	1.50±0.09	0.76±0.04
		14	222.71±12.18	1.82±0.09	0.82±0.07 <sup>2)</sup>
		21	242.67±16.22	2.11±0.10	0.91±0.16 <sup>2)</sup>
补虚	8	7	200.72±11.11	1.31±0.06	0.66±0.03
		14	229.43±17.83	2.05±0.10	0.89±0.08 <sup>2)</sup>
		21	242.45±16.32	2.09±0.13	0.88±0.16 <sup>2)</sup>
贝那普利	1.5×10 <sup>-3</sup>	7	206.01±6.12	1.29±0.06	0.63±0.04
		14	236.23±17.71	1.85±0.06	0.79±0.07 <sup>2)</sup>
		21	241.68±16.32	2.10±0.17	0.87±0.12 <sup>2)</sup>

注:与同时期假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与同时期模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;21 d 时肾衰泄浊汤与其他 3 个治疗组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

察,细胞核呈现蓝褐色,胶原纤维呈现蓝色(阳性),红细胞呈现橘红色,纤维素呈现紫红色。正常组大鼠的肾脏组织胶原染色主要位于肾小管基底膜及基底膜的周围,肾小管间质内染色较少。模型组大鼠的肾脏组织肾间质内蓝染胶原纤维沉积明显,有大量炎性细胞浸润。肾衰泄浊汤组,补虚方组和祛邪方组大鼠肾脏组织肾间质内的蓝染胶原纤维沉积较模型组明显少,炎性细胞浸润程度较模型组明显低。其中肾衰泄浊汤组蓝染胶原纤维沉积程度最轻。与贝那普利组比较,肾衰泄浊汤组蓝染胶原纤维沉积程度较轻。见图 2。肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组分治疗可显著预防 UUO 后第 14, 21 天的间质损伤,与模型组比较,肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组在 UUO 后第 14, 21 天的间质损伤评分和间质胶原的积累均明显降低( $P < 0.05$ )。见表 3。

**3.3 对 UUO 大鼠肾组织各蛋白表达的影响** 除假手术组外,各组在第 14, 21 天的肾组织中 α-SMA,



A. 假手术组; B. 模型组; C. 贝那普利组; D. 肾衰泄浊汤组; E. 补虚方组; F. 祛邪方组(图2同)

图1 肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组对UUO大鼠肾脏组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of SXTE on renal histopathology in UUO rats(HE,×200)

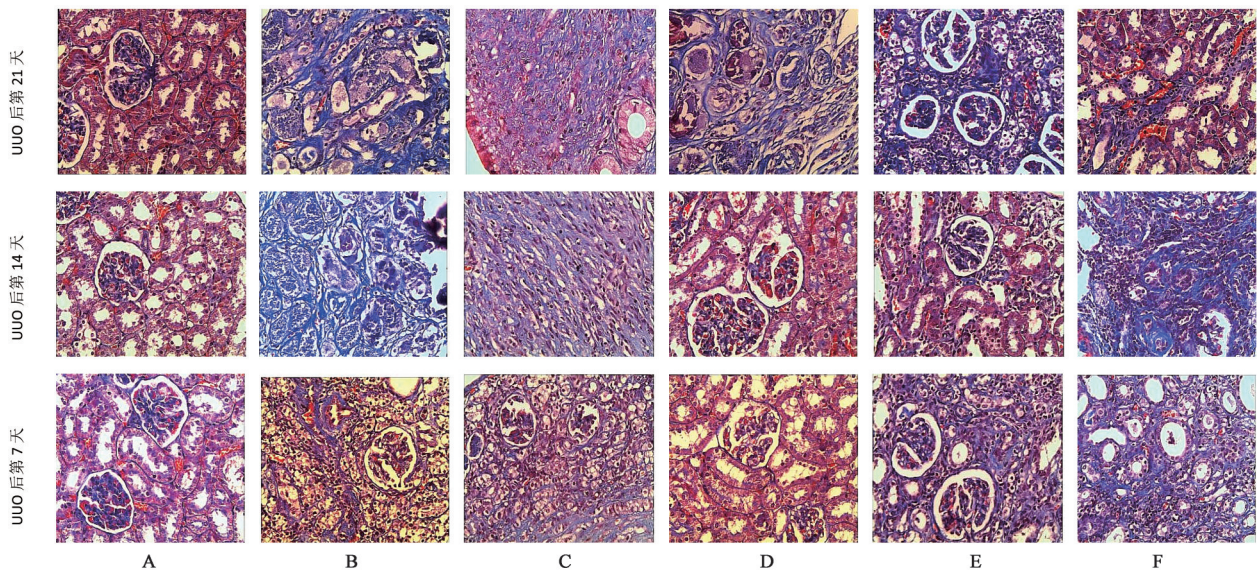


图2 肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组对UUO大鼠肾脏组织胶原纤维的影响(Masson,×200)

Fig. 2 Effect of SXTE on collagen fibers of kidney tissue in UUO rats(Masson,×200)

PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$ 的蛋白表达均较第7天明显增加( $P < 0.05$ )。与假手术组比较,模型组大鼠在手术后第14, 21天的肾组织中 $\alpha$ -SMA, PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$ 的蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,贝那普利组,肾衰泄浊汤组和补益方组在手术后第14天的肾组织中PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$ 的蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ),并且肾衰泄浊汤组在PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGFR- $\beta$ 的增加程度高于贝那普利组( $P < 0.05$ )。

在手术后第21天,肾衰泄浊汤组的肾组织中NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGFR- $\beta$ 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。在手术后第14, 21天,补益方组的PDGFA蛋白表达明显高于祛邪方组( $P < 0.05$ )。见图3,表4。

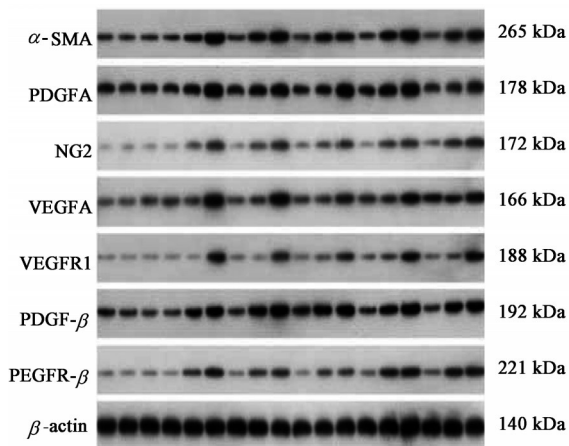
**3.4 对UUO大鼠肾组织各mRNA相对表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠在手术后第21天的肾组织中 $\alpha$ -SMA, PDGFA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF- $\beta$ , PDGFR- $\beta$ 的mRNA相对表达量均明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,肾衰泄浊汤组在手术后第21天的肾组织中 $\alpha$ -SMA, PDGFA,

表3 肾衰泄浊汤及其补虚、祛邪组分对UUO大鼠间质损伤评分和间质胶原的积累的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of SXTE on interstitial damage score and interstitial collagen accumulation in rats( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	t/d	间质性损伤评分/分	纤维性皮质间质区/%
假手术	-	7	0.10±0.01	3.22±0.19
		14	0.10±0.01	3.49±0.31
		21	0.10±0.01	3.31±0.22
模型	-	7	1.76±0.13 <sup>1)</sup>	11.26±2.41 <sup>1)</sup>
		14	2.64±0.20 <sup>1)</sup>	16.37±2.57 <sup>1)</sup>
		21	2.82±0.21 <sup>1)</sup>	18.61±3.02 <sup>1)</sup>
肾衰泄浊汤	8	7	2.03±0.16	10.16±2.09
		14	2.16±0.18 <sup>2)</sup>	11.52±2.45 <sup>2)</sup>
		21	1.92±0.17 <sup>2)</sup>	12.18±1.94 <sup>2)</sup>
祛邪方	8	7	1.73±0.15	10.90±1.79
		14	2.15±0.16 <sup>2)</sup>	12.42±2.09 <sup>2)</sup>
		21	2.05±0.17 <sup>2)</sup>	13.51±2.10 <sup>2)</sup>
补虚	8	7	1.71±0.14	10.81±2.66
		14	2.25±0.15 <sup>2)</sup>	12.75±2.18 <sup>2)</sup>
		21	2.12±0.15 <sup>2)</sup>	13.39±2.33 <sup>2)</sup>
贝那普利	1.5×10 <sup>-3</sup>	7	1.72±0.15	9.69±1.56
		14	2.14±0.17 <sup>2)</sup>	12.05±1.76 <sup>2)</sup>
		21	2.16±0.18 <sup>2)</sup>	12.80±1.72 <sup>2)</sup>

注:与同时期假手术组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与同时期模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05。



A~C.假手术7,14,21 d组;D~F.模型7,14,21 d组;G~I.贝那普利7,14,21 d组;J~L.肾衰泄浊汤7,14,21 d组;M~O.补益方7,14,21 d组;P~R.祛邪方7,14,21 d组

图3 各组大鼠肾组织各蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression in renal tissues of rats in each group

NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGF-β, PDGFR-β的mRNA相对表达量均明显降低(P<0.05),并且肾衰

泄浊汤组在手术后第21天中α-SMA, NG-2, VEGFA, VEGFR1, PDGFR-β的mRNA相对表达量明显低于贝那普利组(P<0.05)。在手术后第21天,补益方组的VEGFR1的mRNA相对表达量明显高于祛邪方组(P<0.05),而PDGFR-β的mRNA相对表达量明显低于祛邪方组(P<0.05)。见表5。

#### 4 讨论

肌成纤维细胞作为产生细胞外基质的主要细胞,在RIF发生发展过程中起着重要作用<sup>[10-12]</sup>。在细胞外基质中,肌成纤维细胞促进成纤维细胞增殖<sup>[13]</sup>;同时也产生一系列促进RIF发展的生长因子和蛋白水解酶<sup>[14]</sup>。尽管目前肌成纤维细胞的起源还存在诸多争议<sup>[15]</sup>,但大量研究发现周细胞是其重要来源,如LIN等<sup>[16]</sup>研究证实,炎症损伤后周细胞逐渐脱离血管壁并分化为肌成纤维细胞,参与间质纤维化。此外,肾脏损伤发生后,内皮细胞与周细胞间正常关系被破坏,导致肾小管周围毛细血管稳定性受到影响,诱发RIF<sup>[17]</sup>。因此,本研究以周细胞参与RIF发生发展过程为切入点,选择UUO大鼠作为动物模型,观察了肾衰泄浊汤复方在抗RIF过程中是否对周细胞及相关信号通路产生调控作用。结果显示,肾衰泄浊汤治疗可显著预防UUO后第14,21天的肾间质损伤,并且进一步PCR分析显示,肾衰泄浊汤治疗降低了周细胞标志分子(α-SMA, NG-2)及VEGF/VEGFR信号通路分子(VEGFA, VEGFR1, PDGFR-β)的mRNA表达。在周细胞-细胞外基质间相互作用过程中,肌成纤维细胞VEGF/VEGFR信号通路活化,激活周细胞PDGF/PDGFR信号通路,促进肌成纤维细胞的增殖,并且当阻断上述通路后,RIF程度有所减轻<sup>[18]</sup>。因此,本研究结果提示肾衰泄浊汤对UUO大鼠RIF的拮抗作用可能与对周细胞及相关信号通路的调控作用有关。

根据RIF发展过程中的临床表现及发病特点,中医将其归属于“癥积”范畴。络脉瘀塞与癥积二者互为恶性循环,最终导致肾功能尽失,尿毒症形成<sup>[19]</sup>。经过十余年的临床研究,总结出RIF病机为“虚,湿,瘀,毒”四大方面,并在此基础上研制出肾衰泄浊汤。方中生大黄苦寒,可泄浊毒,使湿毒从肠胃出。辅以蒲公英解毒利尿,槐花清瘀热,生牡蛎软坚除湿,使湿毒下泄;重用生黄芪,补气升阳,利尿退肿,巴戟天补益脾肾,助阳化气<sup>[20]</sup>。全方共奏泄浊解毒,补脾益肾之功<sup>[8,21]</sup>。在临床诊治中,发现肾衰泄浊汤在治疗慢性肾衰竭患者方面取得了较好疗效<sup>[8-9]</sup>。因此,本研究基于RIF的本虚(脾肾

表4 肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组对UUO大鼠肾组织各蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of SXTE on expression of each protein index in UUO rat renal failure model( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	t/d	$\alpha$ -SMA / $\beta$ -actin	PDGFA / $\beta$ -actin	NG-2 / $\beta$ -actin	VEGFA / $\beta$ -actin	VEGFR1 / $\beta$ -actin	PDGF- $\beta$ / $\beta$ -actin	PDGFR- $\beta$ / $\beta$ -actin
假手术	-	7	9.38±0.05	12.21±0.04	3.39±0.05	7.92±0.06	4.18±0.04	7.23±0.05	4.22±0.06
		14	8.82±0.07	11.92±0.05	4.41±0.06	8.32±0.06	2.92±0.06	6.99±0.08	3.48±0.04
		21	8.62±0.04 <sup>1)</sup>	11.38±0.04	4.07±0.06	10.12±0.05	7.30±0.06	5.75±0.07	3.88±0.05
模型	-	7	9.03±0.04	11.65±0.04	3.83±0.05	9.53±0.06	3.48±0.08	5.49±0.08 <sup>1)</sup>	2.98±0.06 <sup>1)</sup>
		14	16.32±0.04 <sup>1)</sup>	15.05±0.05 <sup>1)</sup>	9.33±0.04 <sup>1)</sup>	8.91±0.04 <sup>1)</sup>	5.72±0.06 <sup>1)</sup>	11.19±0.05 <sup>1)</sup>	8.62±0.04 <sup>1)</sup>
		21	25.08±0.06 <sup>1)</sup>	23.16±0.05 <sup>1)</sup>	18.71±0.05 <sup>1)</sup>	22.02±0.07 <sup>1)</sup>	11.92±0.07 <sup>1)</sup>	15.32±0.06 <sup>1)</sup>	17.24±0.06 <sup>1)</sup>
贝那普利	1.5×10 <sup>-3</sup>	7	9.47±0.05	11.66±0.05	4.29±0.06	9.22±0.06	4.47±0.06	7.09±0.05	4.11±0.06
		14	17.87±0.06	16.78±0.04 <sup>2)</sup>	11.17±0.05 <sup>2)</sup>	10.24±0.04	12.68±0.07 <sup>2)</sup>	13.61±0.04 <sup>2)</sup>	9.73±0.04 <sup>2)</sup>
		21	23.79±0.04	20.06±0.06 <sup>2)</sup>	17.71±0.06	20.32±0.07	13.08±0.07 <sup>2)</sup>	19.71±0.05 <sup>2)</sup>	11.99±0.07 <sup>2)</sup>
肾衰泄浊汤	8	7	9.61±0.04	11.67±0.06	4.62±0.05	9.53±0.06	4.81±0.06	8.66±0.04	3.83±0.05
		14	16.56±0.06	18.58±0.05 <sup>2)</sup>	13.29±0.05 <sup>2)</sup>	12.42±0.06 <sup>2)</sup>	13.29±0.04 <sup>2)</sup>	14.88±0.05 <sup>2)</sup>	13.19±0.07 <sup>2,3)</sup>
		21	24.08±0.06	24.12±0.04	16.42±0.06 <sup>2)</sup>	18.54±0.06 <sup>2)</sup>	10.19±0.08 <sup>2)</sup>	16.27±0.07	10.61±0.06 <sup>2)</sup>
补益方	8	7	9.83±0.06	12.41±0.06	4.56±0.04	9.80±0.06	5.56±0.07	7.08±0.06	5.28±0.07
		14	20.77±0.06	19.22±0.06 <sup>2,3,4)</sup>	13.47±0.05 <sup>2)</sup>	10.79±0.06 <sup>2)</sup>	14.08±0.05 <sup>2)</sup>	12.89±0.08 <sup>2)</sup>	15.48±0.06 <sup>2,3)</sup>
		21	25.33±0.05	23.82±0.06 <sup>3)</sup>	16.71±0.07	22.87±0.06	13.01±0.04	17.14±0.06 <sup>2)</sup>	16.58±0.05
祛邪方	8	7	9.81±0.05	11.43±0.05	5.50±0.06	10.61±0.06	5.08±0.04	6.83±0.05	5.43±0.06
		14	20.22±0.07	13.07±0.06	15.91±0.05 <sup>2)</sup>	11.37±0.05 <sup>2)</sup>	11.62±0.07 <sup>2,3)</sup>	14.47±0.06 <sup>2)</sup>	15.63±0.04 <sup>2,3)</sup>
		21	23.74±0.06	17.36±0.06 <sup>2)</sup>	22.71±0.05	23.28±0.06	15.13±0.07 <sup>2)</sup>	16.06±0.07	16.78±0.07

注:与同时期假手术组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与同时期模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05;与同时期贝那普利组比较<sup>3)</sup>P<0.05;补益方组与祛邪方组比较<sup>4)</sup>P<0.05(表5同)。

表5 肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组对UUO大鼠肾组织各mRNA相对表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of SXTE on relative expression of mRNA in UUO rat renal failure model( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	时间/d	$\alpha$ -SMA	PDGFA	NG-2	VEGFA	VEGFR1	PDGF- $\beta$	PDGFR- $\beta$
假手术	-	7	1.02±0.22	0.97±0.17	0.99±0.08	0.90±0.10	1.03±0.09	1.02±0.19	1.02±0.10
		14	0.89±0.19	1.06±0.11	0.94±0.12	1.07±0.18	1.11±0.23	1.05±0.16	0.94±0.11
		21	0.84±0.11	1.06±0.14	1.00±0.14	0.89±0.17	1.06±0.11	1.00±0.19	1.05±0.11
模型	-	7	1.01±0.22	0.98±0.20	1.17±0.15	1.13±0.23	1.00±0.10	1.21±0.13	1.06±0.10
		14	2.11±0.25 <sup>1)</sup>	1.44±0.19 <sup>1)</sup>	1.47±0.09 <sup>1)</sup>	0.91±0.17	1.01±0.13	1.58±0.18 <sup>1)</sup>	2.98±0.13 <sup>1)</sup>
		21	3.89±0.43 <sup>1)</sup>	3.24±0.31 <sup>1)</sup>	3.37±0.29 <sup>1)</sup>	2.05±0.37 <sup>1)</sup>	4.29±0.44 <sup>1)</sup>	2.25±0.38 <sup>1)</sup>	5.60±0.77 <sup>1)</sup>
贝那普利	1.5×10 <sup>-3</sup>	7	1.12±0.28	1.07±0.11	0.99±0.10	0.94±0.12	1.00±0.19	0.96±0.15	0.91±0.11
		14	1.68±0.19 <sup>2)</sup>	1.58±0.22	1.92±0.13	1.13±0.17	1.27±0.24	1.60±0.27	2.22±0.15 <sup>2)</sup>
		21	2.43±0.43 <sup>2)</sup>	2.11±0.18 <sup>2)</sup>	2.29±0.19 <sup>1,2)</sup>	1.93±0.3	3.03±0.31 <sup>2)</sup>	1.97±0.28	3.96±0.37 <sup>2)</sup>
肾衰泄浊汤	8	7	0.93±0.19	0.95±0.12	1.13±0.12	0.90±0.18	0.97±0.13	0.96±0.09	1.10±0.13
		14	1.42±0.31 <sup>2)</sup>	0.98±0.10 <sup>2)</sup>	1.48±0.14	1.15±0.21	0.97±0.11	1.35±0.20	2.30±0.25
		21	1.88±0.33 <sup>2,3)</sup>	1.90±0.20 <sup>2)</sup>	1.90±0.21 <sup>2,3)</sup>	1.54±0.14 <sup>2,3)</sup>	1.97±0.36 <sup>2,3)</sup>	1.77±0.42 <sup>2)</sup>	2.52±0.16 <sup>2,3)</sup>
补益方	8	7	1.19±0.16	1.12±0.13	1.18±0.13	0.97±0.16	0.97±0.14	0.97±0.11	0.95±0.17
		14	2.00±0.25	1.63±0.20	1.73±0.19	1.17±0.18	1.11±0.21	1.61±0.17	2.21±0.34 <sup>2)</sup>
		21	2.90±0.29 <sup>2)</sup>	2.05±0.31 <sup>2)</sup>	2.31±0.18 <sup>2)</sup>	1.72±0.19	2.54±0.36 <sup>2,4)</sup>	1.98±0.41	3.36±0.44 <sup>2,4)</sup>
祛邪方	8	7	0.86±0.17	0.89±0.18	1.09±0.13	0.83±0.20	1.05±0.16	1.13±0.20	1.08±0.17
		14	1.56±0.21	1.42±0.15	1.67±0.13	1.00±0.19	0.99±0.10	1.59±0.20	2.20±0.37 <sup>2)</sup>
		21	2.79±0.39 <sup>2)</sup>	1.86±0.17 <sup>2)</sup>	2.21±0.29 <sup>2)</sup>	2.07±0.28	1.98±0.20 <sup>2)</sup>	2.31±0.36	4.21±0.59 <sup>2)</sup>

虚为主),标实(瘀,湿,毒)的病理学微观辨证特征,兼以“标本分治和同治”微观辨证要点,揭示中药复方肾衰泄浊汤及其不同组分对周细胞及其相关信号通路调控的干预机制。结果显示,肾衰泄浊汤及其补虚,祛邪组分治疗可显著预防UUO后第14,21天的间质损伤。虽然在Western blot检测结果中,补益方组和祛邪方组在UUO后第14,21天的周细胞及其相关细胞信号通路的主要蛋白水平表达较高,但是Real-time PCR分析显示两组在UUO后第21天的周细胞及其相关细胞信号通路的大部分标志物的mRNA表达出现降低,表明补虚,祛邪组分均有助于抑制周细胞异常增殖,持续用药将有助于缓解RIF的“微形癥积”中医病机。此外,在UUO后第21天,Western blot检测结果显示肾衰泄浊汤组中大部分周细胞标志分子的蛋白表达均显著降低,表明将补虚,祛邪组分合用后疗效得以增强,充分体现了肾衰泄浊汤复方在治疗RIF方面具有多环节,多层次,多靶点的中药药理学作用优势病种特点。

综上所述,本研究证实了肾衰泄浊汤复方及其补虚,祛邪组分在治疗进行性RIF方面的有效性。在UUO大鼠模型中,肾衰泄浊汤复方及其补虚,祛邪组分减弱RIF的可能机制与抑制周细胞及其相关细胞信号通路激活有关。

[参考文献]

[1] 林云,曹灵. 苦碟子注射液对输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(7):139-146.

[2] 杨艺萱,张兆芳,刘卉,等. 当归红芪超滤物对辐射后心肌成纤维细胞的增殖和胶原分泌的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(12):136-142.

[3] ARMULIK A, GUILLEM G, BESTSHOLTZ B C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises[J]. Dev Cell,2011,21(2):193.

[4] ROJAS A, CHANG F C, LIN S L, et al. The role played by perivascular cells in kidney interstitial injury[J]. Clin Nephrol,2012,77(5):400.

[5] 俞晓燕,赵玉武. 血管周细胞与间充质干细胞关系的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(1):85-88.

[6] 董谦谦,颜建云. 血管钙化参与细胞相关研究的新进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2018,26(11):1111-1115.

[7] 郎珈馨,陈丽萌. 周细胞在肾脏微血管损伤中的作用

[J]. 中华肾脏病杂志,2018,34(5):396-400.

[8] 叶俊玲,李罗德,晏子友,等. 肾衰泄浊汤对肾间质纤维化大鼠OPN,CD44的调节作用[J]. 中国医药科学,2013,3(2):25-27.

[9] 晏子友,申屠进军,熊芳. 肾衰泄浊汤对BMP7, $\alpha$ -SMA调节作用的探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,27(8):685-687.

[10] 徐旖旎,付凌云,蒋朝晖,等. 氧化苦参碱对醛固酮诱导心肌成纤维细胞增殖抑制作用的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):89-94.

[11] 杨艺萱,张兆芳,刘卉,等. 当归红芪超滤物对辐射后心肌成纤维细胞的增殖和胶原分泌的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(12):136-142.

[12] 刘莹露,石格,曹东维,等. 肾脏周细胞-肌成纤维细胞转分化的病理机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志,2018,43(21):4192-4197.

[13] 王一婧,袁晓捧,吴旦斌,等. 补阳还五汤干预缺氧预适应成纤维细胞间充质干细胞迁移的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(23):112-118.

[14] 刘畅,洪兰,金红花. 五味子酚对心肌成纤维细胞增殖和转化生长因子 $\beta_1$ 及I,III型胶原蛋白表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(33):7-12.

[15] BARNES J L, GLASS W F. Renal interstitial fibrosis: a critical evaluation of the origin of myofibroblasts[J]. Contrib Nephrol,2011,169:73-93.

[16] LIN S L, CHANG F C, SCHRIMPF C, et al. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis[J]. Am J Pathol, 2011, 178(2):911-923.

[17] 李磊,刘建勋,郭浩,等. 周细胞与微血管疾病及中医药研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(16):3072-3077.

[18] LI Y, REN H T. Endostatin inhibits fibrosis by modulating the PDGFR/ERK signaling pathway: an *in vitro* study[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2017, 18(11): 994-1001.

[19] 张琼,陈定国,沈宏春. 基于肾内微癥积理论探讨中医抗肾纤维化策略[J]. 四川中医,2014,32(12):24-25.

[20] 吉晶,何立群. 中西医防治肾纤维化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(19):221-228.

[21] 晏子友,赵海,赖小美. 肾衰泄浊汤对肾间质纤维化小鼠HGF,TGF $\beta_1$ 的调节作用[J]. 中国中医药科技,2007,14(2):74-75.

[责任编辑 周冰冰]