

大黄泄浊方对慢性肾衰竭大鼠炎症及SOCS3/TLR4通路的影响

辛鑫^{1,2}, 吴振华^{1,2}, 檀淼³, 高飞⁴, 杨凤文², 陈素枝², 张倩², 檀金川^{1,2*}

(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:观察大黄泄浊方对慢性肾衰竭(CRF)大鼠信号传导抑制因子3(SOCS3)/Toll样受体4(TLR4)通路的干预作用,探讨其减轻肾组织炎症反应的分子机制。方法:取雄性SD大鼠90只,随机留取15只为假手术组,剩余75只为造模组,行5/6肾切除术复制CRF大鼠模型,模型复制成功后,随机分为模型组,大黄泄浊方低、中、高剂量(6.825、13.65、27.3 g·kg⁻¹)组、尿毒清颗粒组(2.6 g·kg⁻¹),分别予相应剂量的药物灌胃,连续灌胃8周。给药结束后,苏木素-伊红(HE)染色及马松(Masson)染色观察大鼠肾脏组织病理形态改变;检测大鼠血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、血尿酸(UA)水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C反应蛋白(CRP)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肾组织中SOCS3和TLR4 mRNA的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测信号传导抑制因子3(SOCS3)、TLR4、核转录因子- κ B(NF- κ B)、髓样分化因子88(MyD88)蛋白的表达;免疫组化法检测NF- κ B、MyD88、NOD样受体蛋白3(NLRP3)、黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)蛋白的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠肾组织发生明显的炎症反应,血SCr、BUN、UTP、IL-6、TNF- α 、CRP水平明显升高($P<0.05$),肾组织中SOCS3蛋白及SOCS3 mRNA含量明显下调,TLR4、NF- κ B、MyD88、NLRP3、AIM2蛋白及TLR4 mRNA含量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,大黄泄浊方和尿毒清颗粒可明显减轻肾组织中的炎症反应,降低血SCr、BUN、UTP、IL-6、TNF- α 、CRP的表达水平($P<0.05$),肾组织中SOCS3蛋白及SOCS3 mRNA含量显著上升,TLR4、NF- κ B、MyD88、NLRP3、AIM2蛋白及TLR4 mRNA含量均明显下降($P<0.05$)。结论:大黄泄浊方可减少炎症因子的释放和表达,抑制炎症反应,改善肾功能,其机制可能与调控SOCS3/TLR4信号通路有关。

[关键词] 大黄泄浊方;慢性肾衰竭;炎症;肾间质纤维化;信号传导抑制因子3;Toll样受体4

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0095-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222436

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221116.1123.001.html>

[网络出版日期] 2022-11-17 13:50:18

Effect of Dahuang Xiezhuo Prescription on Inflammation and SOCS3/TLR4 Pathway in Rats with Chronic Renal Failure

XIN Xin^{1,2}, WU Zhenhua^{1,2}, TAN Miao³, GAO Fei⁴, YANG Fengwen², CHEN Suzhi²,
ZHANG Qian², TAN Jinchuan^{1,2*}

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

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

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

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

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect of Dahuang Xiezhuo prescription (DHXZ) on inflammation and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)/Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway in rats with

[收稿日期] 2022-06-28

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2021030)

[第一作者] 辛鑫,在读硕士,从事中西医结合肾病研究,E-mail:811328233@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:2511271452@qq.com

chronic renal failure (CRF), and to explore its molecular mechanism in alleviating renal inflammatory response. **Method:** The 90 male SD rats, 15 were randomly selected as sham group, and the remaining 75 were used as modeling group to replicate CRF rat model by 5/6 nephrectomy. After successful modeling, the rats were randomly divided into model group, DHXZ low-, medium-, high-dose groups (6.825, 13.65, 27.3 g·kg⁻¹) and Niaoduqing Granules group (2.6 g·kg⁻¹). The drug intervention groups received corresponding drugs by gavage for 8 consecutive weeks. After administration, hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to observe the morphological changes of rat renal tissue, and blood creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and blood uric acid (UA) were tested. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the serum contents of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and C-reactive protein (CRP). The mRNA expressions of SOCS3 and TLR4 in renal tissue were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expressions of SOCS3, TLR4, nuclear transcription factor (NF- κ B) and myeloid differentiation factor (MyD88) were detected by Western blot. Immunohistochemistry was used to determine the protein expressions of NF- κ B, MyD88, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and melanoma deficiency factor 2 (AIM2). **Result:** Compared with the sham group, the model group had a significant inflammatory response in renal tissue, and an increase in blood SCr, BUN, UTP, IL-6, TNF- α and CRP ($P<0.05$). The protein and mRNA expressions of SOCS3 in renal tissue of rats in the model group were lower while the protein expressions of TLR4, NF- κ B, MyD88, NLRP3 and AIM2 and the mRNA expression of TLR4 were higher than those in the sham group ($P<0.05$). Compared with the model group, DHXZ and Niaoduqing granules groups presented markedly reduced inflammatory response in renal tissue and decreased blood SCr, BUN, UTP, IL-6, TNF- α and CRP ($P<0.05$). Additionally, DHXZ and Niaoduqing granules up-regulated the protein and mRNA expressions of SOCS3 in renal tissue while down-regulated the protein expressions of TLR4, NF- κ B, MyD88, NLRP3 and AIM2 and the mRNA expression of TLR4 ($P<0.05$). **Conclusion:** DHXZ can reduce the release and expression of inflammatory factors, inhibit the inflammatory response and improve renal function, and the mechanism may be related to the regulation of SOCS3/TLR4 signaling pathway.

[Keywords] Dahuang Xiezhuo prescription; chronic renal failure; inflammation; renal interstitial fibrosis; suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3); Toll-like receptor 4

慢性肾衰竭(CRF)是各种慢性肾脏病(CKD)持续进展的共同结局,CRF为肾小球滤过率(GFR)下降至失代偿期阶段,相当于CKD 4~5期^[1]。CRF的发病机制比较复杂,除与原发病有关,还与肾脏慢性炎症密切相关,而减轻肾脏炎症反应,可以延缓CRF进展^[2]。有研究发现信号传导抑制因子3(SOCS3)/Toll样受体(TLR)4信号通路与炎症反应密切相关^[3]。其中SOCS3蛋白是负向反馈调节因子,具有明显的抗炎作用,可参与肾脏免疫反应及肾间质纤维化等多种病理变化的调控^[4]。研究发现TLR是一组重要的介导炎症反应的跨膜蛋白,能够介导多种感染性和非感染性肾脏疾病^[5],TLR4是TLR家族中最关键的一员,在肾小管上皮细胞、内皮细胞等多种细胞内表达,激活TLR4信号通路,可诱发炎症反应,参与多种病因所致的肾纤维化。而有关SOCS3/TLR4信号通路在CRF研究中未见相

关报道。

CRF病程迁延,易反复,治疗周期较长,目前肾脏替代治疗在治疗CRF中发挥着重要作用,但其并发症较多,且费用高,难以普及。因此,安全、有效的中医药治疗方式在CRF的治疗过程中具有明显优势。大黄泄浊方由大黄、黄芪、土茯苓、水牛角丝、丹参、当归、醋龟甲、地龙、积雪草组成,是河北省中医院檀金川教授根据CRF的“脾肾亏虚、浊毒阻络”的病机特点所创立的。前期研究显示,大黄泄浊方具有“健脾益肾、泄浊通络”的功效,以其为基础方的中药复方可显著降低慢性肾衰竭患者血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、尿酸(UA)水平,下调血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子水平,改善肾脏纤维化,延缓慢性肾衰进展,是治疗早、中期CRF的基础方^[6]。前期实验研究显示,本方可通过

调控 CRF 大鼠肾组织内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、转录因子 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 的表达,抑制内质网应激,延缓肾间质纤维化^[7]。有研究显示,黄芪多糖可诱导 SOCS3 的表达,发挥抗炎作用,黄芪甲苷和大黄素可调控 TLR4/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路,抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的释放,延缓肾脏纤维化及肾小球硬化^[8-10]。故本研究探讨大黄泄浊方对 SOCS3/TLR4 信号通路及其下游炎症信号蛋白的影响,进一步探究其防治 CRF 的分子机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 90 只,6~8 周龄,体质量 (140±20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,动物合格证号 SCXK (辽)2020-0001,饲养于河北中医学院实验动物中心,自由进食、饮水。本实验得到河北中医学院动物伦理委员会的批准 (编号 DWLL2019035)。

1.2 药物 大黄泄浊方由大黄 10 g、黄芪 25 g、土茯苓 20 g、水牛角丝 15 g、丹参 12 g、当归 10 g、醋龟甲 15 g、地龙 9 g、积雪草 15 g 组成,所有药物为一方制药有限公司生产的中药颗粒,批号分别为 9065783、9060603、9040873、9052093、9075843、9080283、9055023;尿毒清颗粒 (北京诺华制药有限公司,批号 Z20073256)

1.3 试剂 BUN、SCr、UA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所,货号分别为 C013、C011、C012);苏木素-伊红 (HE) 染色液 (北京索莱宝有限公司,货号 G1120);IL-6、TNF- α 、CRP 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司,货号分别为 ml102828、ml002859、ml038253);TRIzol 试剂 (北京 Servicebio 公司,货号 G3013);实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 试剂盒 (北京 HyClone 公司,货号 SH30538.02);SOCS3、TLR4、NF- κ B、髓样分化因子 88 (MyD88)、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、黑色素瘤缺乏因子 2 (AIM2) 兔来源一抗和山羊抗兔二抗 (美国 Affinity 公司,货号分别为 DF6133、AF7017、AF5006、AF5195、DF7438、DF3514、S0001);马松 (Masson) 染色液 (珠海贝索生物技术有限公司,货号 G1340); β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (中杉金桥生物有限公司,货号 16AF0207)。

1.4 仪器 7170A 型全自动生化仪 (日本日立公司);Multiskan Sky 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司);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 (日本奥林巴斯公司);Mini-PROTEAN3 电泳系统、Mini Trans-Blot 转移系统 (美国伯乐公司);Stepone plus 型 Real-time PCR 仪 (美国 ABI 公司);Kodak Image Station 2000MM 成像系统 (美国 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 采用 5/6 肾切除复制 CRF 大鼠模型^[11],先切除大鼠左侧肾上下极 (单肾 2/3),2 周后切除右侧整个肾。假手术组仅行双肾被膜剥离术。术后 4 周,随机抽取假手术组和造模组大鼠各 2 只,麻醉处死后留取血液和肾组织样本。观察大鼠血清 BUN、SCr、UA 水平及肾脏病理学变化。与假手术组比较,造模组大鼠血清 SCr、BUN 和 UA 水平显著升高,大鼠肾组织中出现大量的炎性浸润和明显的肾纤维化等病理表现,则模型制备成功^[12-13]。

2.2 分组及干预 将 90 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组和造模组 (分别为 15 只、75 只),造模组大鼠行 5/6 肾切除术复制 CRF 模型,模型制备成功后,随机将造模组大鼠分为模型组,大黄泄浊方低、中、高剂量组,尿毒清颗粒组,每组 15 只。依据人与大鼠体表面积法换算临床等效剂量,以 60 kg 的成人每日用 130 g 计算,大鼠给药剂量为成人的 6.3 倍,大鼠给药量=(130/60)×6.3=13.65 g·kg⁻¹,此为中剂量,低、高剂量则分别为中剂量的 0.5、2 倍,即大黄泄浊方低、中、高剂量组给药剂量分别为 6.825、13.65、27.30 g·kg⁻¹。同理,尿毒清颗粒组给药量为 2.60 g·kg⁻¹;均按照大鼠 10 mL·kg⁻¹ 的体质量灌胃给药,假手术组和模型组在给予等体积的蒸馏水灌胃。每日 1 次,连续给药 8 周。末次给药后,大鼠禁食不禁水 12 h 后,腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉采血,分离血清测量相关指标,取出大鼠残余肾脏,冰上测量残肾大小,留取 2 份肾皮质,一份置于-80 °C 冰箱保存备用,另一份放于 4% 的多聚甲醛固定,用于石蜡包埋。

2.3 大鼠一般情况观察 每日观察大鼠的精神状态、体质量变化、反应灵敏度、饮食、二便等一般情况,并做好记录。

2.4 肾脏病理学检查 用 4% 多聚甲醛固定肾组织 12 h,经乙醇由低到高体积分数脱水,石蜡包埋切片,脱腊水冲洗,切成 4 μ m 的薄片,分别进行 HE 染色,Masson 染色,乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后,光学显微镜下观察肾脏组织形态学。

2.5 血液生化指标检测 严格遵循试剂盒的要求,

检测大鼠血清中血SCr、BUN、UA的含量。

2.6 ELISA检测大鼠血清IL-6、TNF- α 水平 取大鼠腹主动脉血5 mL, 3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10.5 cm), 取出血清, 采用ELISA检测大鼠血清IL-6、TNF- α 、CRP含量, 严格按照ELISA试剂盒的要求进行操作。

2.7 Real-time PCR检测肾组织SOCS3和TLR4 mRNA的表达 取肾组织100 mg, 用TRIzol试剂提取肾组织总RAN, 并逆转录为cDNA, 用Real-time PCR检测SOCS3和TLR4 mRNA的表达水平, 反应条件设置为94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 72 °C退火延伸25 s, 循环30次。采用相对定量方法进行分析, mRNA的相对表达量采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算。 β -actin作为内参, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 序列为SOCS3上游5'-ACAGCCTTTCAGTGCAGAGTA-3', 下游5'-CGTAA GAGCAGGCGAGTGTA-3', 长度156 bp; TLR4上游5'-AGTGCCCCGCTTTCAGCTTT-3', 下游5'-TGCCAGAGCGGCTACTCAGA-3', 长度200 bp; β -actin上游5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3', 下游5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3', 长度240 bp。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SOCS3/TLR4信号通路蛋白的表达 取肾组织100 mg研磨均匀, 置于离心管内, 加入组织裂解液3 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径7 cm), 取其上清, 测定蛋白浓度。取总蛋白50 μ g, 与Loading buffer混合, 在100 °C条件下变性5 min, 使用SDS-PAGE凝胶进行电泳分离后转PVDF膜, 室温下浸入5%脱脂牛奶中封闭2 h, 滴入一抗SOCS3(1:1 000), TLR4、NF- κ B(1:2 000)、MyD88(1:2 500), β -actin为内参(1:5 000)4 °C孵育过夜, 洗膜后加入二抗(1:5 000), 室温环境下孵育2 h, 再次洗膜后, 采用电化学发光(ECL)法使蛋白条带充分显色, 运用Image J软件对各组蛋白条带进行灰度值分析。

2.9 免疫组化法检测NF- κ B、MyD88、NLRP3、AIM2蛋白的表达 取肾组织100 g, 石蜡包埋后切4 μ m薄片, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化, 乙二胺四乙酸(EDTA)修复抗原, 阻断内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭, 加入一抗NF- κ B、MyD88(1:500), NLRP3(1:100), AIM2(1:200), 4 °C孵育过夜, PBS洗涤后, 加入二抗(1:1 000), 孵育30 min。DAB染色避光显色, 苏木素复染, 中性树脂进行封片, 光学显微镜下观察, 出现棕褐色颗粒沉积则为阳性结

果, 并拍照片。使用Image Pro plus 6.0软件进行结果分析。

2.10 统计学分析 采用SPSS 20.0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, 两两比较时, 方差齐用最小显著性差异法(LSD), 方差不齐用Games-Howell, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

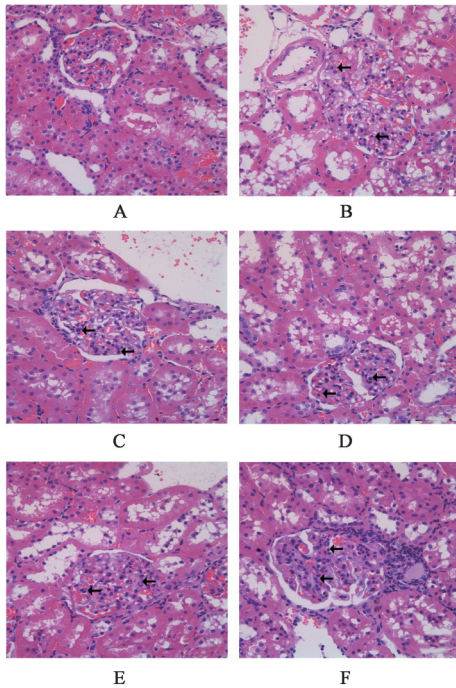
3.1 对大鼠一般情况的影响 假手术组大鼠精神状态可, 体质量正常, 反应灵敏, 毛色光泽, 尾、爪色淡红, 饮食及活动良好, 模型组大鼠精神萎靡, 反应迟钝, 体型消瘦, 毛色暗淡萎黄, 尾、爪色淡, 饮食及活动明显减少; 大黄泄浊方各剂量组和尿毒清颗粒组状态欠佳, 体型较瘦, 毛色偏暗, 饮食及活动情况一般, 大黄泄浊方中、高剂量组疗效更加显著。

3.2 对CRF大鼠肾脏病理改变的影响 HE染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠系膜细胞和基质增生, 大量炎性细胞浸润及纤维化。与模型组比较, 大黄泄浊方各剂量组和尿毒清颗粒组, 肾小球损伤减轻, 系膜细胞和基质增生减轻, 肾组织炎性细胞减少。其中大黄泄浊方中、高剂量组较大黄泄浊方低剂量组和尿毒清颗粒组改善较明显。见图1。Masson染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组可见肾组织中沉积大量的胶原纤维, 肾脏纤维化明显, 与模型组比较大黄泄浊方各剂量组和尿毒清颗粒组, 肾组织沉积的胶原纤维有所减少, 肾脏纤维化有所改善, 其中大黄泄浊方中、高剂量组较大黄泄浊方低剂量组和尿毒清颗粒组效果较明显。见图2。

3.3 对CRF大鼠血清SCr、BUN、UA的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清SCr、BUN、UA水平明显增高($P < 0.05$); 与模型组比较, 各药物干预组大鼠血清SCr、BUN、UA水平均有不同程度下降($P < 0.05$); 与大黄泄浊方低剂量组和尿毒清颗粒组比较, 大黄泄浊方中、高剂量组疗效更为明显($P < 0.05$)。见表1。

3.4 对CRF大鼠血清IL-6、TNF- α 、CRP含量的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中IL-6、TNF- α 、CRP水平明显升高, 大黄泄浊方和尿毒清组大鼠IL-6、TNF- α 、CRP含量明显下降($P < 0.05$), 与大黄泄浊方低剂量组和尿毒清颗粒组比较, 大黄泄浊方中、高剂量组疗效更明显($P < 0.05$)。见表2。

3.5 对CRF大鼠肾脏中SOCS3和TLR4 mRNA表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠SOCS3



注:A.假手术组;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7同)

图1 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏病理形态改变的影响(HE,×400)

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

mRNA水平明显降低、TLR4 mRNA水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,大黄泄浊方和尿毒清组大鼠SOCS3 mRNA有不同程度的升高($P<0.05$),TLR4 mRNA指标有不同程度的下降($P<0.05$),与大黄泄浊方低剂量组和尿毒清颗粒组比较,大黄泄浊方中、高剂量组疗效更明显($P<0.05$)。见表3。

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

Table 1 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on serum SCr, BUN and UA levels 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/nmol·L ⁻¹	UA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
假手术组		37.55±1.03	6.26±0.67	101.35±6.24
模型组		116.70±1.16 ¹⁾	23.12±0.57 ¹⁾	259.52±10.18 ¹⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	110.54±0.81 ³⁾	21.41±0.69 ³⁾	191.08±9.45 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)}	165.16±8.37 ^{3,5,7)}
大黄泄浊方高剂量组	27.3	89.18±1.17 ^{3,5,7)}	16.64±0.81 ^{3,5,7)}	157.28±8.49 ^{3,5,7)}
尿毒清颗粒组	2.6	107.26±0.85 ^{3,5)}	20.58±0.59 ^{3,5)}	182.51±7.41 ^{3,5)}

注:与假手术组比较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5同)

3.7 对大鼠肾脏中NF- κ B、MyD88、NLRP3、AIM2蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠NF- κ B、MyD88、NLRP3、AIM2蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,大黄泄浊方和尿毒清组大

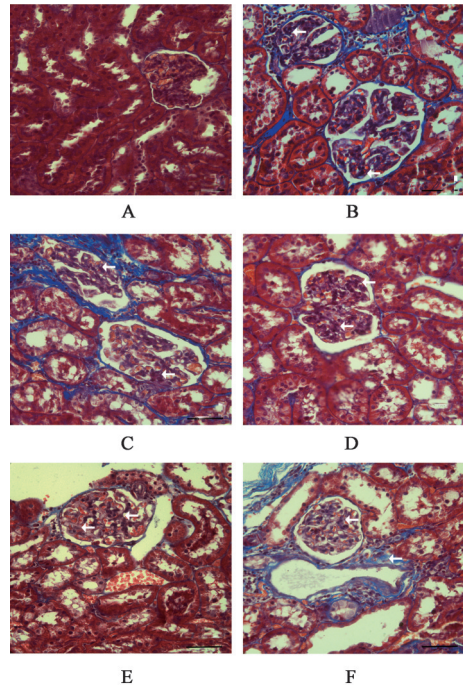


图2 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏病理形态改变的影响(Masson,×400)

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

3.6 对CRF大鼠肾脏中SOCS3/TLR4信号通路蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠SOCS3、TLR4、NF- κ B、MyD88蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,大黄泄浊方和尿毒清组大鼠SOCS3蛋白表达明显升高($P<0.05$),TLR4、NF- κ B、MyD88蛋白表达明显降低($P<0.05$),与大黄泄浊方低剂量组、尿毒清颗粒组比较,大黄泄浊方中、高剂量组疗效更为明显($P<0.05$)。见图3、表4。

鼠NF- κ B、MyD88、NLRP3、AIM2蛋白表达下降($P<0.05$),大黄泄浊方中、高剂量组疗效明显优于低剂量组和尿毒清颗粒组($P<0.05$)。见图4-图7、表5。

表2 大黄泄浊方对CRF大鼠血清IL-6、TNF-α、CRP水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on serum IL-6, TNF-α and CRP levels in CRF rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	CRP/mg·L ⁻¹
假手术组		23.12±1.47	51.33±5.63	8.37±0.15
模型组		69.14±1.77 ¹⁾	92.76±6.12 ¹⁾	75.62±1.40 ¹⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	47.46±1.38 ³⁾	77.18±5.31 ³⁾	66.79±1.16 ³⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	34.59±1.88 ^{3,5,7)}	68.61±4.87 ^{3,5,7)}	56.43±1.42 ^{3,5,7)}
大黄泄浊方高剂量组	27.3	33.92±1.95 ^{3,5,7)}	64.59±4.42 ^{3,5,7)}	53.04±1.32 ^{3,5,7)}
尿毒清颗粒组	2.6	45.91±1.85 ^{3,5)}	74.26±5.02 ^{3,5)}	62.61±2.12 ^{3,5)}

表3 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中SOCS3和TLR4 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on SOCS3 and TLR4 mRNA expression in kidneys of CRF rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOCS3	TLR4
模型组		0.33±0.04 ¹⁾	3.24±0.26 ¹⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	0.48±0.03 ³⁾	2.57±0.31 ³⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	0.58±0.06 ^{3,5,7)}	2.17±0.15 ^{3,5,7)}
大黄泄浊方高剂量组	27.3	0.71±0.04 ^{3,5,7)}	1.67±0.13 ^{3,5,7)}
尿毒清颗粒组	2.6	0.52±0.04 ^{3,5)}	2.32±0.19 ^{3,5)}

注:设假手术组各指标mRNA表达量均为1

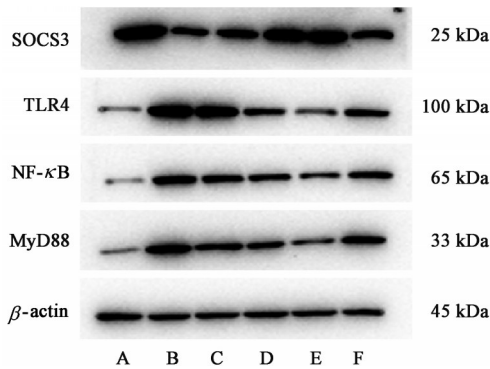


图3 CRF大鼠肾脏中SOCS3/TLR4信号通路蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of SOCS3/TLR4 signaling pathway in kidney of CRF rats

表4 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中SOCS3/TLR4信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on protein expression of SOCS3/TLR4 signaling pathway in kidneys of CRF rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOCS3/β-actin	TLR4/β-actin	NF-κB/β-actin	MyD88/β-actin
假手术组		1.561±0.019	0.347±0.006	0.238±0.003	0.348±0.022
模型组		1.042±0.017 ¹⁾	1.556±0.056 ¹⁾	1.241±0.008 ¹⁾	1.302±0.015 ¹⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	1.123±0.016 ³⁾	1.466±0.077 ³⁾	1.112±0.004 ³⁾	1.110±0.002 ³⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	1.455±0.028 ^{3,5,7)}	0.940±0.016 ^{3,5,7)}	0.911±0.016 ^{3,5,7)}	0.918±0.006 ^{3,5,7)}
大黄泄浊方高剂量组	27.3	1.483±0.041 ^{3,5,7)}	0.609±0.007 ^{3,5,7)}	0.701±0.009 ^{3,5,7)}	0.721±0.004 ^{3,5,7)}
尿毒清颗粒组	2.6	1.302±0.008 ^{3,5)}	1.184±0.007 ^{3,5)}	1.163±0.003 ^{3,5)}	1.267±0.026 ^{3,5)}

4 讨论

近年来,CRF发病率高达11%,且呈逐年上升趋势,加重了社会及家庭经济负担^[14]。研究证实,炎症是影响CRF发生发展及预后的关键因素,炎症因子的过表达使肾脏出现持续的微炎症状态,导致肾脏纤维化,加重肾组织的损伤,使肾功能持续恶化^[15]。因此,抑制肾脏炎症是防治CRF的重要途径。

中医无CRF之病名,现代中医根据其临床表现,将其归属于“关格”“水肿”“虚劳”等范畴。CRF关键病机为本虚标实,本虚以脾肾亏虚为主,为病之根本,标实为内生有形实邪,主要表现为水湿,痰浊,瘀血,浊毒相互胶结,为病之关键。根据CRF本虚标实的病机特点,檀金川教授创制大黄泄浊方来延缓肾脏纤维化,保护肾功能。该方立意明确,切合病机,方中黄芪、酒大黄共为君药,补泄兼顾,以行健脾益肾,泄浊解毒之效;土茯苓、积雪草清热祛湿,共为臣药以搜剔肾络之湿热蕴毒;当归、丹参、地龙、醋龟甲共为佐药行活血散瘀,消癥通络之效;水牛角丝散瘀解毒,并为使药,引诸药入血分,以助清血分之瘀毒,诸药合用,配伍得当,共奏健脾益肾、清热利湿、化瘀通络、泄浊解毒之功效。临床中,以大黄泄浊方为主的中药复方可显著降低CRF患者BUN、SCr水平,下调血清中IL-1β、IL-6、TNF-α

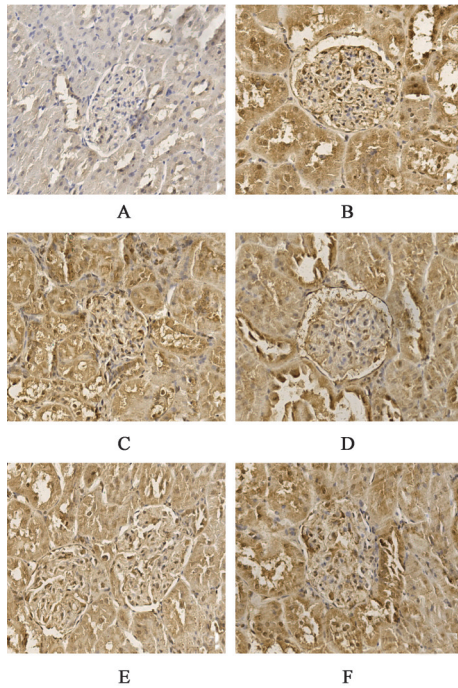


图4 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织中NF-κB蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on NF-κB protein expression in kidney tissue of CRF rats (IHC,×400)

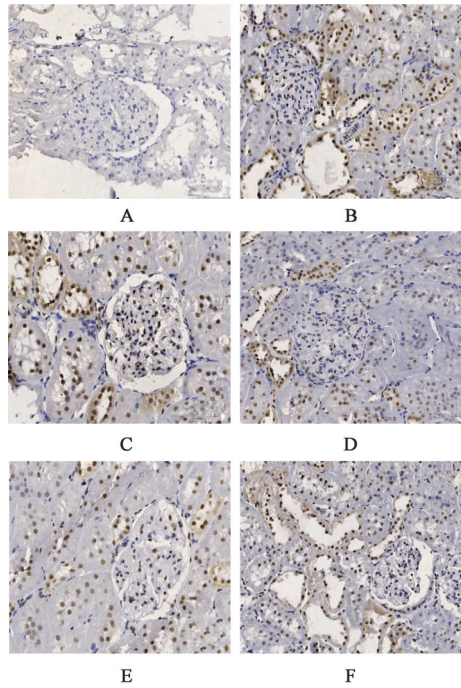


图6 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织中NLRP3蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

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

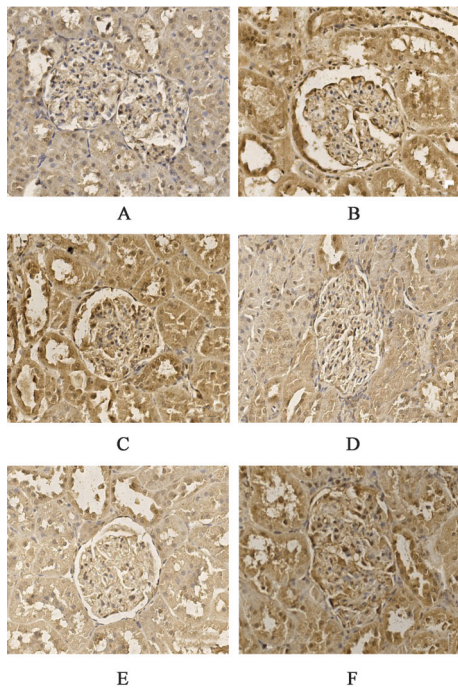


图5 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织中MyD88蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on MyD88 protein expression in kidney tissue of CRF rats (IHC,×400)

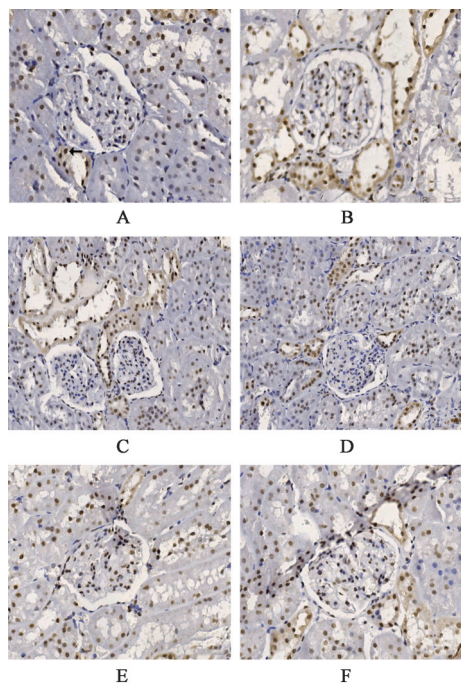


图7 大黄泄浊方对CRF大鼠肾组织中AIM2蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 7 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on AIM2 protein expression in kidney tissue of CRF rats (IHC,×400)

等炎症因子水平,抑制肾脏纤维化。进一步实验研究发现,其作用机制与其抑制内质网应激,延缓肾间质纤维化有关^[6-7]。

CRF患者普遍存在微炎症状态,并且是心血管事件的独立危险因素之一,临床表现为患者全身没有明显的感染迹象,患者血清中IL-6、TNF-α、C反

表5 大黄泄浊方对CRF大鼠肾脏中SOCS3/TLR4信号通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Dahuang Xiezhuo prescription on expression of SOCS3/TLR4 signaling proteins in kidney of CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NF-κB	MyD88	NLRP3	AIM2
假手术组		0.052 0±0.000 5	0.044 7±0.000 9	0.008 6±0.000 4	0.018 8±0.000 5
模型组		0.153 2±0.002 9 ¹⁾	0.156 1±0.001 9 ¹⁾	0.056 7±0.000 1 ¹⁾	0.041 2±0.000 2 ¹⁾
大黄泄浊方低剂量组	6.825	0.132 4±0.000 4 ³⁾	0.137 7±0.017 0 ³⁾	0.047 4±0.000 8 ³⁾	0.032 7±0.000 1 ³⁾
大黄泄浊方中剂量组	13.65	0.127 0±0.000 2 ^{3,5,7)}	0.102 9±0.004 1 ^{3,5,7)}	0.024 5±0.000 1 ^{3,5,7)}	0.028 9±0.000 1 ^{3,5,7)}
大黄泄浊方高剂量组	27.3	0.114 3±0.001 9 ^{3,5,7)}	0.084 7±0.000 8 ^{3,5,7)}	0.018 7±0.000 1 ^{3,5,7)}	0.025 2±0.000 2 ^{3,5,7)}
尿毒清颗粒组	2.6	0.144 7±0.001 9 ^{3,5)}	0.133 4±0.037 0 ^{3,5)}	0.039 3±0.000 1 ^{3,5)}	0.037 2±0.000 2 ^{3,5)}

应蛋白(CRP)等炎症因子明显升高^[16]。同样地,5/6肾切除构建的慢性肾功能衰竭动物模型,亦存在微炎症状态^[17]。IL-6、TNF-α和CRP等炎症因子是机体内重要的炎症介质,参与机体的炎症反应,与慢性肾病的发展密切相关^[18-19]。IL-6是促炎症因子,可导致肾小管间质细胞增殖和细胞外基质沉积及肾小球系膜细胞增殖、硬化,引发肾脏纤维化^[20]。TNF-α由单核-巨噬细胞产生,参与CRF整个炎症反应过程,可提高凝血因子活性,加重凝血反应,破坏血管内皮功能,加重组织纤维化,损伤肾功能^[21]。CRP是CRF患者最敏感的炎症标志物之一,反映CRF患者炎症程度,其血清表达水平与CRF的病情呈正相关^[22]。因此,通过监测血清IL-6、TNF-α、CRP等炎症因子水平能够判定病情进展情况。本研究结果显示,模型组大鼠血清SCr、BUN、UA水平明显升高,予大黄泄浊方干预后,血清SCr、BUN、UA水平明显降低。模型组大鼠肾脏病理出现大量的炎症细胞浸润和胶原纤维沉积,以及大鼠血清中IL-6、TNF-α、CRP等炎症因子表达明显升高,表明CRF大鼠存在慢性炎症反应。予大黄泄浊方干预后,CRF大鼠病理状况明显改善,血清炎症因子明显减少,表明大黄泄浊方可抑制肾脏炎症反应,保护肾功能的作用。

TLR4是在炎症反应中较为重要的细胞因子,肾脏损伤的过程中,大量TLR4蛋白被激活,与MyD88蛋白结合后,通过MyD88依赖性途径,激活下游转录因子NF-κB,进而促进肾脏炎症反应,诱导肾纤维化^[23]。NF-κB是经典的炎症信号通路,激活NF-κB后,可促进IL-6、IL-1β、IL-8、TNF-α、MCP-1等细胞因子的表达,同时IL-6的释放可促进CRP的激活,进一步促进TNF-α、IL-6等释放,导致肾脏炎症反应^[18,24]。在肾缺血再灌注损伤大鼠模型中,TLR4/NF-κB/MyD88激活后,肾脏发生炎症反应和氧化应激损伤^[25]。杨少华等^[26]发现5/6肾切除模型

大鼠模型中会出现糖酵解增强,其与慢性肾纤维化有直接关系。当NF-κB过度表达时,肾脏纤维化明显,糖酵解关键因子M2型丙酮酸激酶(PKM2)的表达会升高,PKM2是激活NLRP3和黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)炎症小体的关键因子,其机制与PKM2促进真核生物翻译起始因子2-α激酶2(EIF2AK2)EIF2AK2的磷酸化密切相关^[27-28]。多项研究表明,NLRP3和AIM2炎症小体广泛参与了多种肾脏疾病的发病机制,在肾脏的炎症反应及肾脏纤维化的过程中扮演着重要角色^[29]。NLRP3和AIM2激活后,胱天蛋白酶-1(Caspase-1),诱导下游炎症因子IL-1、IL-18的释放。KOMADA等^[30]研究发现,UUO小鼠在敲除AIM2^{-/-}和AIM2^{-/-}NLRP3^{-/-}两种基因后,裂解的Caspase-1和IL-1β、IL-18的低水平表达,提示NLRP3和AIM2炎症小体与肾脏间质炎症反应密切相关。

相反地,抑制TLR4的表达,对控制肾脏炎症反应,延缓CRF具有重要意义。SOCS3蛋白作为一种典型的负反馈调节因子,在肾小管上皮细胞和肾小球系膜细胞中表达,调节可抑制肾小管细胞的过度分化及细胞的过度增殖,抑制肾脏炎症反应,延缓CKD的进展^[31]。在糖尿病肾病大鼠中,通过上调SOCS3表达,可减轻肾脏炎症反应,减轻肾脏纤维化,保护肾功能^[32]。HILBERATH等^[33]发现在急性肺损伤中,SOCS3被激活后可减轻TLR4介导一系列反应。激活SOCS3可以通过抑制缺血期TLR4/MyD88信号通路,减轻炎症反应,发挥对脑缺血的保护作用^[34]。多项研究表明,SOCS3对TLR4具有明显的负向调节作用,上调SOCS3表达,可抑制TLR4及其相关信号通路引发的炎症反应,同时也可直接控制IL-6、TNF-α等炎症因子^[35]。本研究结果显示,模型组大鼠肾组织中SOCS3蛋白及mRNA明显减少,TLR4蛋白及mRNA明显升高,以及介导的MyD88、NF-κB、NLRP3、AIM2蛋白明显升高,予

大黄泄浊方干预后,SOCS3表达明显上升,TLR4蛋白及介导的相关蛋白明显下降,且剂量越高效果越明显,提示大黄泄浊方通过调控SOCS3/TLR4信号通路,可减轻炎症反应,抑制纤维化,保护肾功能。

综上所述,大黄泄浊方能明显降低SCr、BUN、UA水平,上调肾组织SOCS3的表达水平,降低TLR4的表达,抑制炎症反应,延缓慢性肾衰竭的进展,其机制可能与其调控SOCS3/TLR4信号通路有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 慢性肾衰竭临床特征及误诊疾病[J]. 临床误诊误治, 2020, 33(10):2.

[2] GUO H Y, ZHANG L Y. Resveratrol provides benefits in mice with type II diabetes induced chronic renal failure through AMPK signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16:333.

[3] 郑晓佳, 陈莘莘, 刘阳, 等. 加味当归芍药散对慢性萎缩性胃炎大鼠SOCS3/TLR4信号通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15):4128-4135.

[4] 肖俊, 胡艳萍, 图露霞, 等. TLR4、SOCS3、miR-203在IgA肾病鼠肾组织中的表达变化及意义[J]. 广东医学, 2019, 40(5):631-634.

[5] 邹涵, 黄志敏, 唐宇, 等. 三七注射液对慢性肾衰竭大鼠肠道失调信号通路及肠道菌群结构的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(2):269-272.

[6] 曹雯萱, 辛鑫, 檀森, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(21):81-89.

[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):1-4.

[8] 陶新磊, 刘丹华, 田旭, 等. 黄芪多糖诱导SOCS3表达对鸡巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(11):4284-4291.

[9] 徐郁琴, 丁艳平, 刘淑宁, 等. 黄芪甲苷通过Toll样受体4/核因子 κ B通路介导辐射所致肾损伤的防护作用[J]. 解剖学报, 2021, 52(4):621-627.

[10] 赵大鹏, 刘一灵, 薛晓颖, 等. 论大黄在慢性肾衰竭中应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(1):13-17.

[11] 张喜奎, 王巧花, 王旭丽, 等. 桃核承气汤对慢性肾衰竭大鼠的调控机制研究[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11):36-40.

[12] 余柯娜, 麻志恒, 钟利平, 等. SD大鼠与C57小鼠5/6肾切除慢性肾功能衰竭模型的比较[J]. 中国比较医

学杂志, 2015, 25(8):48-53.

[13] 梁亮, 王圣志, 何学红. 参芪泄浊饮对腺嘌呤致慢性肾衰大鼠模型肾组织细胞外基质表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1):27-29.

[14] LI H, FENG Y, SUN W, et al. Antioxidation, anti-inflammation and anti-fibrosis effect of phosphorylated polysaccharides from *Pleurotus djamor* mycelia on adenine-induced chronic renal failure mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 170:652-663.

[15] 李秀文, 李达丽. 木犀草素对慢性肾衰竭大鼠的保护作用[J]. 中医药导报, 2021, 27(3):36-39.

[16] 杨梦, 胡思远, 李琳, 等. 基于“虚气留滞”理论探讨慢性肾衰竭“微炎症状态”的病机及中药防治进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16):229-236.

[17] 陈紫薇, 陈明, 何凯杰, 等. 5/6肾脏切除动物疾病模型的中医证候探索及扶正化瘀降浊通络方证测验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 7(4):1-6.

[18] LAVETI D, KUMAR M, HEMALATHA R, et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: A review [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2013, 12(5):349-361.

[19] 黄玉红, 王洁. 慢性肾脏病所致微炎症状态的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(1):128-133.

[20] 高飞, 王泽泽, 杨冰, 等. 基于TLR4/NF- κ B信号通路探讨加味升降散对膜性肾病大鼠肾组织纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6):47-54.

[21] KE Y, DU C, WANG X, et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice [J]. *Blood*, 2017, 129(19):2667-2679.

[22] 王冬梅, 张振宇. 慢性肾功能衰竭患者血清TNF- α 、CRP、IL-6水平的检验及临床意义分析[J]. 中国医学创新, 2021, 18(31):163-166.

[23] 沈金峰, 胡良伟, 胡芳, 等. 大蒜素抑制慢性肾衰竭大鼠炎症反应[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(2):375-381.

[24] 刘晶, 唐晓红, 李孜. C反应蛋白与肾脏疾病发病机制的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(9):837-839.

[25] 刘洋, 于洋, 周南, 等. 鞣花酸抑制TLR4/NF- κ B/MyD88信号通路减轻炎症反应改善肾缺血再灌注大鼠肾损伤[J]. 解剖科学进展, 2020, 26(6):713-717.

[26] 杨少华, 代晓燕, 周秋根. 进展性肾病大鼠模型肾皮能量代谢的变化及其机制[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(5):373-380.

[27] 杨柳易, 王琛, 王蒙, 等. 肾衰II号方对慢性肾功能衰竭大鼠糖酵解限速酶HK2及PKM2表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11):5807-5811.

- [28] 谢姗,徐兴欣. PKM2调控的巨噬细胞糖酵解在糖尿病肾病炎症中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(24):2394-2402.
- [29] 武勇,张敏敏. 黑色素瘤缺乏因子2炎症小体在肾脏疾病中的研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(6):492-496.
- [30] KOMADA T, CHUNG H, LAU A, et al. Macrophage uptake of necrotic cell DNA activates the AIM2 inflammasome to regulate a proinflammatory phenotype in CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(4): 1165-1181.
- [31] 刘宇翔,刘文媛,胡雅玲,等. 益肾胶囊对高糖环境下小鼠足细胞 SOCS3、p-JAK2 和 p-STAT3 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(10): 854-858.
- [32] ZHU G Q, JEON S H, LEE K W, et al. Electric stimulation hyperthermia relieves inflammation via the suppressor of cytokine signaling 3-Toll like receptor 4 pathway in a prostatitis rat model[J]. World J Mens Health, 2020, 38(3):359.
- [33] HILBERATH J N, CARLO T, PFEFFER M A, et al. Resolution of Toll-like receptor 4-mediated acute lung injury is linked to eicosanoids and suppressor of cytokine signaling 3 [J]. FASEB J, 2011, 25(6): 1827-1835.
- [34] 潘琳娜,樊萍,刘海云,等. SOCS3在脂多糖诱导体外氧糖剥夺大脑皮层细胞药理性预适应中的作用[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2020, 49(5):550-555.
- [35] 唐小玲. 基于 JAK/STAT/SOCS 信号通路研究芪石肾舒胶囊对糖尿病肾病大鼠的作用及机制[D]. 泸州: 西南医科大学, 2020.

[责任编辑 孙丛丛]