

芪蛭真武汤改善单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化及其机制

黄笛, 谭颖颖*, 张琪, 夏娟娟, 许生
(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的:探讨芪蛭真武汤对单侧输尿管结扎(UUO)大鼠肾间质纤维化的影响,及对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smads和氧化应激反应的作用。方法:将30只雄性SD大鼠,随机分为假手术组、模型组、芪蛭真武汤高剂量组、芪蛭真武汤低剂量组、厄贝沙坦组($n=6$)。模型组及各治疗组行左侧输尿管结扎,假手术组不结扎输尿管,仅分离输尿管后关闭腹腔。术后1 d开始灌胃给药,假手术组、模型组予无菌蒸馏水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,芪蛭真武汤高剂量组予芪蛭真武汤 $22.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,低剂量组予芪蛭真武汤 $11.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,厄贝沙坦组予厄贝沙坦片 $0.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠分别于术后14 d取材,取材前收集24 h尿液,检测24 h尿蛋白定量(24 h-Upr);收集血清用以检测肌酐(SCr),尿素氮(BUN);取结扎侧肾组织行苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色,光镜下观察其病理改变;免疫组化法(IHC)检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA), I型胶原蛋白(Col- I)和纤维连接蛋白(FN)的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3, 非吞噬细胞氧化酶IV(NOX4)的表达。结果:与假手术组比较,模型组SCr, BUN, 胶原容积分数(CVF), 24 h-Upr均增高($P<0.05$, $P<0.01$),模型组 α -SMA, Col- I, FN, TGF- β_1 , p-Smad3, NOX4蛋白的表达均较高($P<0.05$);与模型组比较,芪蛭真武汤高剂量组和厄贝沙坦组的SCr, BUN, CVF, 芪蛭真武汤高剂量组的24 h-Upr均较低($P<0.05$);各中药治疗组 α -SMA, Col- I, FN, TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3, NOX4的表达均较少($P<0.05$)。结论:芪蛭真武汤能够减少UUO大鼠的尿蛋白,保护肾脏功能,抑制肾间质纤维化的发生、发展;其机制可能与抑制TGF- β_1 /Smads信号通路和氧化应激反应有关。

[关键词] 肾间质纤维化; 芪蛭真武汤; 单侧输尿管梗阻; 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smads; 氧化应激反应

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0045-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201878

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200730.1349.003.html>

[网络出版日期] 2020-7-30 15:14

Effect of Qizhi Zhenwutang in Improving Renal Interstitial Fibrosis and Its Mechanism on Unilateral Ureteral Obstruction in Rats

HUANG Di, TAN Ying-ying*, ZHANG Qi, XIA Juan-juan, XU Sheng
(Shaannxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Qizhu Zhenwutang on renal interstitial fibrosis in rats ligated with unilateral ureter, transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)/Smads and oxidative stress. **Method:** A total of 30 male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, high-dose group, low-dose group and irbesartan group ($n=6$). The left ureter ligation was performed in the model group and the treatment group. In the sham operation group, the ureter was not ligated, only the ureter was separated, and the abdominal cavity was closed. Rats in each group were given drugs by gavage on the next day after operation. Sham operation group and model group were given aseptic distilled water $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage, high-dose Qizhizhenwu Tang group was given $22.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage, low-dose group was given $11.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage, and irbesartan group was given $0.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage. Rats in each group were sacrificed on the 14th day after

[收稿日期] 20200421(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774295)

[第一作者] 黄笛,在读硕士,从事经方辨治肾脏病的研究,E-mail:1429881329@qq.com

[通信作者] *谭颖颖,博士,教授,硕士生导师,从事经方辨治肾脏病的研究,E-mail:yytan2012@163.com

operation, 24-hour urine was collected before sampling, and the total amount of 24 hour urine protein (24 h-Upr) was detected. Blood samples were collected from the abdominal aorta to detect serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN). The tissues were stained with htoxylin eosin (HE) and Masson, and the pathological changes were observed under light microscope, immunohistochemical method was used to detect α -SMA, FN and Col- I expressions. Western blot method was used to detect the expressions of TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3 and NOX4. **Result:** Compared with sham group, SCr, BUN and collagen volume fraction (CVF), 24 h-Upr in model group were all increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The expressions of α -SMA, Col- I, FN, TGF- β_1 , p-Smad3, NOX4 were higher ($P<0.05$). Compared with the model group, SCr, BUN and CVF were lower in high-dose group and irbesartan group ($P<0.05$). 24 h-Upr was lower in high-dose group ($P<0.05$), the expressions of α -SMA, Col- I, FN, TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3, NOX4 in traditional Chinese medicine treatment group were less ($P<0.05$). **Conclusion:** Qizhi Zhenwutang can reduce the urinary protein of UUO rats, protect the renal function, and inhibit the occurrence and development of renal interstitial fibrosis, the mechanism may be related to the inhibition of TGF- β_1 /Smads signaling pathway and oxidative stress response.

[Key words] Qizhi Zhenwutang; renal interstitial fibrosis; unilateral ureteral obstruction; transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)/Smads; oxidative stress reaction

近年来,我国慢性肾脏病(CKD)的患病率逐年升高,而患者的知晓率较低,该病起病隐匿,呈进行性进展,早期患者不易发现,发展至后期,多以昂贵的肾脏替代疗法治疗^[1-2]。CKD随病情恶化,还出现多种并发症,如肾性高血压、电解质紊乱、心力衰竭等,严重者可危及生命。病理研究对于CKD的诊断、指导治疗和判定预后具有重要意义,因此,研究CKD的病理机制,了解药物对CKD病理改变的作用,为寻找有效的靶向药物提供方向。肾间质纤维化(RIF)是CKD发展为终末期肾病(ESRD)的必然途径和最终病理改变^[3-4]。研究表明,RIF的病理特征主要有肌成纤维细胞(MyoF)形成,细胞外基质(ECM)大量积聚,肾小管萎缩,肾小管周围毛细血管损伤,炎性细胞浸润^[5]。MyoF是RIF主要的效应细胞,主要来源于肾小管上皮细胞-间充质转化(EMT),能够分泌大量的胶原成分,增加ECM沉积^[6-7]。ECM的过量积聚和MyoF的形成是RIF的主要病理机制。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)是重要的致纤维化因子,参与了RIF的各个环节。已有研究表明,TGF- β_1 /Smads信号通路能够诱导肌成纤维细胞形成,增加ECM的过量沉积,是RIF中较为经典的信号通路^[8-9]。而氧化应激反应中产生大量的活性氧(ROS)能够介导TGF- β_1 /Smads信号通路,并且直接损伤肾脏固有细胞,是RIF中重要的诱导因子^[10-12]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)是ROS产生的重要来源,其中非吞噬细胞氧化酶IV(NOX4)分布于肾小管上皮细胞,与RIF的形成关系密切^[13-14]。

中医药治疗慢性肾脏病,较为经济实惠,多靶点,临床疗效显著。中医辨治肾脏病能够从整体辨证论治,慢性肾脏病以阳虚为本,水湿、痰浊、淤血为标,治疗以“标本兼治”为则。芪蛭真武汤具温阳利水,益气活血之功,是治疗慢性肾脏病的临床常用方剂。真武汤出自汉代著名医家张仲景所著的《伤寒论》,历代被用以治疗“阳虚水泛”为病机的水肿、心悸、头眩等病证,是温阳利水的代表方剂^[15]。芪蛭真武汤由真武汤原方加黄芪、水蛭2味药物组成,增其补气活血的功效。在慢性肾脏病的各个阶段的治疗中,芪蛭真武汤能够有效改善水肿、倦怠乏力、短气喘息等症状,延缓CKD的进展。本课题组前期通过实验表明芪蛭真武汤能够通过抑制TGF- β_1 /p38 MAPK信号通路,有效降低糖尿病肾病大鼠血糖、血脂,还能减少大鼠尿蛋白,改善肾脏功能。继课题组前期研究,本实验主要研究该方对肾间质纤维化影响,为该方治疗慢性肾脏病提供依据。单侧输尿管梗阻(UUO)模型是经典的肾间质纤维化模型,模拟了肾后性梗阻时,肾脏缺血、缺氧,各类炎症因子激活,肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活等病理改变,最终形成肾间质纤维化,本实验选用该模型,通过芪蛭真武汤对UUO大鼠进行干预,探究该方对UUO大鼠肾间质纤维化的影响,及对TGF- β_1 /Smads和氧化应激反应的作用。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠30只,SPF级,大鼠体质量(180±20)g,购买于成都达硕实验动物有限公司,每天以标准饲料饲养,自由摄食及饮水,适应性喂养1

周。本实验通过陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准,审批号2018326。

1.2 药物 芪蛭真武汤:炮附子9 g,白术12 g,白芍18 g,茯苓18 g,生姜18 g,黄芪30 g,水蛭6 g。购于陕西中医药大学第一附属医院中药房,由陕西中医药大学中药鉴定室胡本祥教授鉴定均符合2015年版《中国药典》标准。厄贝沙坦片(海滨制药有限公司,批号4180309015)。用蒸馏水进行煎煮,先煎炮附子40 min,其余药物冷水浸泡20 min,与附子煎剂同煎1.5 h,滤除药液,再煎1.5 h,合并2次滤液,将各组方的药分别浓缩。将芪蛭真武汤方的药液分别浓缩至生药 $1.11 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低剂量组), $2.22 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高剂量组)。

1.3 试剂 4%多聚甲醛,SABC[兔免疫球蛋白(Ig)G]免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为AR1068,Z191520);苏木素染色液,伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1140,G1100);马松(Masson)染色试剂盒,尿素氮(BUN)测试盒,肌酐(SCr)测定盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为D026-59,C013-2,C011-1);兔抗鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)多克隆抗体,兔抗鼠纤维连接蛋白(FN)抗体,I型胶原(Col-I)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab32575,b2413,19423-1);NOX4抗体,TGF- β_1 抗体,Smad3抗体,磷酸化(p)-Smad3抗体, β -肌动蛋白(β -actin)(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为GB11347,bs-0086R,PLT4335,bs-5459R,bs-0061R)。

1.4 仪器 R136型石蜡切片机(德国Leica公司);TC-120S型生物组织自动脱水机,TB-718EL型冷冻台、包埋机(湖北泰维科技实业股份有限公司);FC3型全自动凝胶成像系统(美国Protein Simple公司);JY96-2N型超声波细胞破碎仪(上海力辰仪器科技有限公司);AU2700型全自动生化分析仪(美国Beckman公司);041BR182076型电泳、转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 将SD大鼠适应性喂养1周,随机分为5组($n=6$),分别为假手术组,模型组,芪蛭真武汤高剂量组(以下简称“芪蛭高剂量组”),芪蛭真武汤低剂量组(以下简称“芪蛭低剂量组”),厄贝沙坦组。除假手术组外,制备UUO模型。假手术组进腹腔后分离左侧输尿管但不结扎。UUO造模方法:腹腔注射1.5%戊巴比妥钠($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射进

行麻醉;麻醉成功后,将大鼠侧卧,碘伏消毒,定位切口,依次切开皮肤、肌层,找出肾脏及输尿管;将输尿管两端分别以4.0缝合线结扎,然后从中段剪断输尿管,将肾复于原位后缝合,即制备成功UUO模型^[16]。术后连续3 d腹腔注射青霉素钠,预防感染。

2.2 给药方法和剂量 造模后次日开始灌胃,各治疗组用药量均按每100 g给药1 mL计算,每周称体质量调整药量。芪蛭真武汤成人每日服量111 g,按人与大鼠体表面积折算,芪蛭真武汤的等效剂量为 $11.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于临床成人剂量的6倍,该剂量为芪蛭低剂量组给药量;将低剂量组的2倍给药量(即 $22.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)作为芪蛭高剂量组给药量,相当于临床成人剂量的12倍;厄贝沙坦片给药剂量为 $0.02 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于临床成人剂量的6倍。假手术组、模型组予无菌蒸馏水 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.3 标本收集 各组大鼠于术后第14天取材,取材前置于代谢笼中,禁食,自由饮水,收集大鼠24 h尿液,记录尿液总量,用以检测尿蛋白。称量大鼠体质量,戊巴比妥钠($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠。待麻醉成功后,腹主动脉取血3 mL左右,静置2 h,以 $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,收集血清用以检测生化指标。切取左侧肾脏,滤纸吸干血,取左肾沿冠状面纵行剖开,用预冷的生理盐水充分冲洗,一半肾脏置于4%多聚甲醛固定,脱水、浸蜡、包埋,制作石蜡切片进行苏木素-伊红(HE)染色,Masson染色和免疫组织化学检测;一半迅速置于液氮中,而后转入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。

2.4 检测方法

2.4.1 SCr, BUN的检测 各组大鼠麻醉后,腹主动脉采血,每个样本取血清200 μL ,自动生化分析仪检测血清尿素氮、血清肌酐,具体实验方法按照相应试剂盒说明进行操作。

2.4.2 24 h尿蛋白(24 h-Upro)的检测 将大鼠放入代谢笼内,禁食不禁水,收集24 h尿液,记录24 h尿液总量,离心后取上清液,运用中点法检测24 h-Upro定量。

2.4.3 HE染色观察肾脏组织病理形态 将石蜡切片脱蜡、水化;苏木素浸染5 min后,伊红浸染8 min;脱水、透明、封片;光镜下观察。

2.4.4 Masson染色观察肾脏组织病理变化 具体操作按试剂盒说明书进行,光镜下观察。每组随机选10个视野,每个视野随机测量5个面积内平均灰度

值,通过灰度调节区分视野内阳性信号面积,计算各组大鼠肾组织纤维化程度用胶原容积分数(CVF)表示,即 $CVF = \frac{\text{胶原面积}}{\text{总面积}}$ 。

2.4.5 免疫组化法检测 α -SMA, Col- I, FN 的表达
石蜡切片脱蜡、水化后,置于枸橼酸缓冲液中煮沸15 min,抗原修复;置3% H_2O_2 中灭活,5% BSA 室温封闭1 h;孵育I抗(α -SMA, Col- I, FN 一抗的稀释比例为1:200, 1:200, 1:300),置于4 °C冰箱过夜;室温孵育二抗1 h;按DAB显色试剂盒说明配制显色液,滴加后镜下控制反应时间;洗涤、苏木素复染、脱水、透明、封片。阳性表达呈棕黄色或深棕色染色,选择染色阳性表达较好的切片,进行光镜观察。每一切片随机取5个不重叠的高倍视野($\times 400$),采用Image Pro Plus图像分析系统进行半定量分析,测定肾间质中阳性表达量,计算标本的平均积分吸光度AA。

2.4.6 Western blot 检测 NOX4, TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3 蛋白的表达
取部分肾组织置于离心管,加入蛋白酶抑制剂、蛋白强裂解液,匀浆、震荡后,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 低温离心10 min,收集上清液,提取蛋白;使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度;

将蛋白溶液按照4:1的比例加入5 \times 蛋白上样缓冲液;制备浓缩胶、分离胶,加入样品后,浓缩胶电压80 V,分离胶120 V,进行SDS-PAGE电泳;200 mA 转膜1 h;脱脂牛奶封闭;稀释一抗,NOX4, TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3 稀释比例为1:1 000, β -actin 稀释比例为1:3 000;封闭,4 °C孵育过夜;二抗稀释3 000倍,室温孵育1 h;曝光后的胶片用显影剂显影;将胶片扫描存档,采用Image J软件对灰度值进行分析。

2.5 统计学分析 实验数据使用SPSS 20.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 方式表达,每组数据进行正态性检验,凡符合正态分布的多组间采用单因素方差分析,组间比较运用t检验,不符合的用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对UUO大鼠肾功能指标SCr, BUN, 24 h-Upro 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠SCr, BUN, 24 h-Upro 值均显著较高($P < 0.01$);与模型组比较,芪蛭真武汤高剂量、厄贝沙坦组SCr, BUN 均明显降低($P < 0.05$),芪蛭真武汤高剂量组24 h-Upro 明显降低($P < 0.05$)。见表1。

表1 芪蛭真武汤对UUO大鼠SCr, BUN及24 h-Upro的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

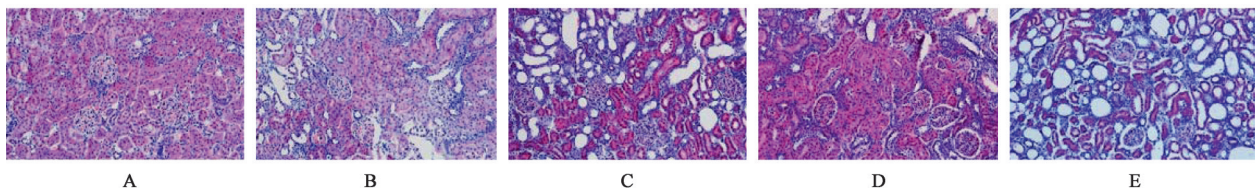
Table 1 Effect of Qizhu Zhenwutang on SCr, BUN, 24 h-Upro ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SCr /μmol·L ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	24 h-Upro /mg
假手术	-	25.50±2.17	7.29±1.35	4.60±1.10
模型	-	40.50±2.74 ¹⁾	12.23±1.56 ¹⁾	9.28±1.42 ¹⁾
芪蛭真武汤	22.2	34.67±3.61 ²⁾	9.37±0.81 ³⁾	7.24±1.45 ²⁾
	11.1	36.17±5.59	11.01±0.85	8.24±1.28
厄贝沙坦	0.02	33.50±3.62 ³⁾	9.92±1.61 ³⁾	8.72±1.72

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

3.2 对UUO大鼠肾脏病理形态的影响 肉眼观察,假手术组左侧肾脏外观红润、结构完整、表面光滑;各手术组左侧肾脏体积明显较大,色泽暗红,肾盂内积水,部分肾组织包膜内可见黄绿色脓液,肾皮质变薄。假手术组未见明显病理改变;模型组可见明显的炎性细胞浸润,肾小管呈现扩张,或萎缩

塌陷,肾小管上皮细胞坏死,肾间质增宽,纤维组织增生;芪蛭真武汤高剂量可见炎性细胞聚集在部分肾间质处,肾小管扩张,部分可见胶样管型;芪蛭真武汤低剂量组和厄贝沙坦组均可见,炎性浸润,肾小管扩张,基底膜断裂,肾小管萎缩、纤维化改变等。见图1。假手术组大鼠肾组织可见少量胶原纤



A.假手术组;B.模型组;C.芪蛭真武汤高剂量组;D.芪蛭真武汤低剂量组;E.厄贝沙坦组(图2~6同)

图1 芪蛭真武汤对大鼠肾脏组织病理形态的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Qizhu Zhenwutang on pathological morphology of rat kidney(HE, $\times 200$)

维,肾组织结构完整;各手术组大鼠肾组织可见不同程度胶原纤维沉积,肾小管部分扩张,部分塌陷、萎缩,肾间质增宽。与假手术组比较,模型组大鼠左肾组织 CVF 值明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,芪蛭真武汤高剂量组、厄贝沙坦组 CVF 值均明显降低 ($P<0.05$)。见表 2,图 2。

3.3 对 UUO 大鼠肾组织 α -SMA, Col- I, FN 表达的影响 与假手术组比较,各手术组左肾组织的 α -SMA, Col- I 和 FN 阳性表达均明显增多 ($P<0.05$);与模型组比较,芪蛭真武汤高、低剂量组、厄贝沙坦组肾组织 α -SMA, Col- I 和 FN 阳性表达均

表 2 芪蛭真武汤对大鼠肾组织纤维化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Qizhi Zhenwutang on renal fibrosis in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CVF/%
假手术	-	0.03±0.027
模型	-	0.48±0.101 ¹⁾
芪蛭真武汤	22.2	0.17±0.036 ³⁾
	11.1	0.40±0.082
厄贝沙坦	0.02	0.27±0.059 ²⁾

明显较少 ($P<0.05$),差异有明显统计学意义。见表 3,图 3~5。

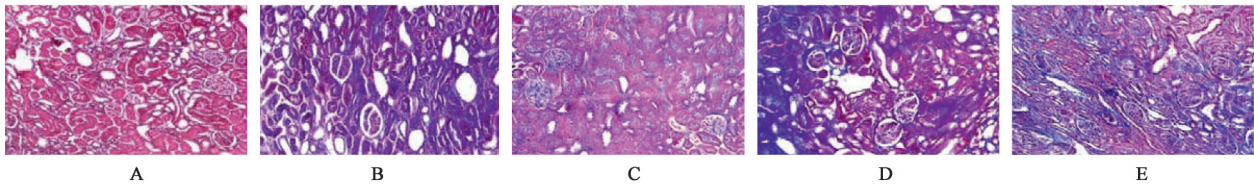


图 2 芪蛭真武汤对大鼠肾脏组织纤维化的影响 (Masson, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Qizhi Zhenwutang on renal fibrosis in rats (Masson, $\times 200$)

表 3 芪蛭真武汤对大鼠肾组织 α -SMA, Col- I, FN 蛋白表达 AA 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Qizhi Zhenwutang on AA expressions of α -SMA, Col- I, FN in rat kidney tissue ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	α -SMA	Col- I	FN
假手术	-	0.026 4±0.004 9	0.009 7±0.001 6	0.018 4±0.001 0
模型	-	0.269 4±0.035 6 ¹⁾	0.036 6±0.003 0 ¹⁾	0.140 5±0.002 7 ¹⁾
芪蛭真武汤	22.2	0.101 7±0.002 7 ²⁾	0.030 5±0.001 4 ²⁾	0.074 9±0.002 5 ²⁾
	11.1	0.122 8±0.005 5 ²⁾	0.032 2±0.001 8 ²⁾	0.100 8±0.005 5 ²⁾
厄贝沙坦	0.02	0.097 8±0.006 1 ²⁾	0.030 6±0.002 5 ²⁾	0.081 1±0.004 0 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表 4 同)。

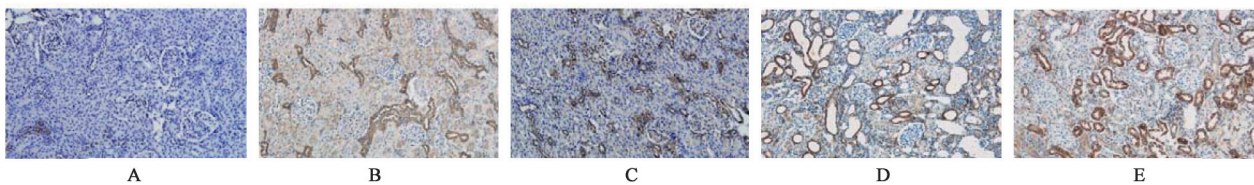


图 3 芪蛭真武汤对大鼠肾组织 α -SMA 表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Qizhi Zhenwutang on expression of α -SMA in rat kidney tissue (IHC, $\times 200$)

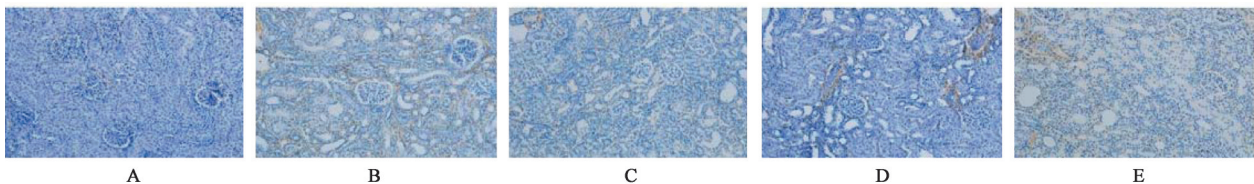


图 4 芪蛭真武汤对大鼠肾组织 Col- I 表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of Qizhi Zhenwutang on expression of Col- I in rat kidney tissue (IHC, $\times 200$)

3.4 对 UUO 大鼠肾组织 NOX4, TGF- β_1 , Smad3, p-Smad3 表达的影响 与假手术组比较,各手术组大鼠 NOX4, p-Smad3, TGF- β_1 的表达均明显升高

($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组大鼠 NOX4, p-Smad3, TGF- β_1 及中药治疗组 Smad3 的表达均明显降低 ($P<0.05$)。见表 4,图 6。

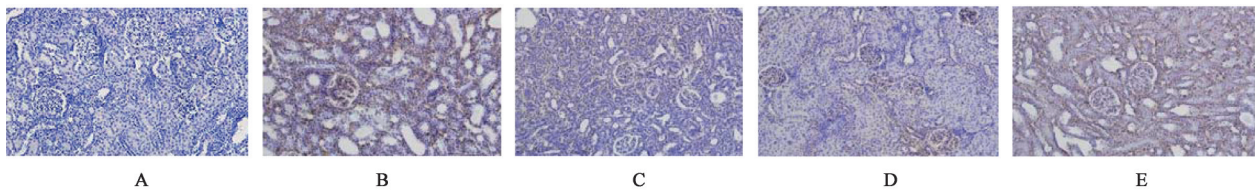


图5 芪蛭真武汤对大鼠肾组织FN表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 5 Effect of Qizhi Zhenwutang on expression of FN in rat kidney tissue(IHC, ×200)

表4 芪蛭真武汤对大鼠肾组织NOX4, Smad3, p-Smad3, TGF-β₁蛋白表达的影响(̄x±s, n=6)

Table 4 Effect of Qizhi Zhenwutang on protein expressions of NOX4, Smad3, p-Smad3, TGF-β₁ in rat kidney tissue (̄x±s, n=6)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NOX4 /β-actin	Smad3 /β-actin	p-Smad3 /β-actin	TGF-β ₁ /β-actin
假手术	-	0.22±0.021	0.85±0.034	0.16±0.021	0.27±0.031
模型	-	1.12±0.010 ¹⁾	0.69±0.006	0.56±0.021 ¹⁾	0.66±0.029 ¹⁾
芪蛭真武汤	22.2	0.58±0.021 ²⁾	0.04±0.008 ²⁾	0.27±0.044 ²⁾	0.46±0.035 ²⁾
	11.1	0.98±0.009 ²⁾	0.14±0.017 ²⁾	0.34±0.029 ²⁾	0.54±0.017 ²⁾
厄贝沙坦	0.02	0.52±0.004 ²⁾	0.65±0.042	0.24±0.040 ²⁾	0.44±0.050 ²⁾

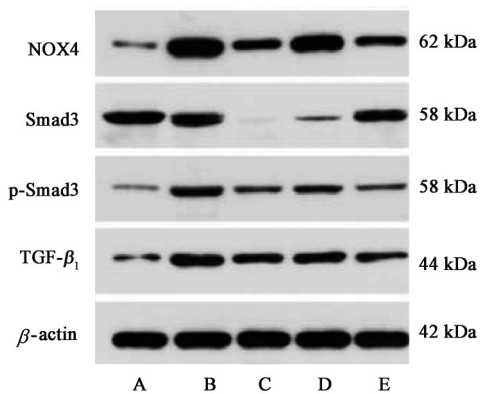


图6 大鼠肾组织NOX4, Smad3, p-Smad3, TGF-β₁蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of of NOX4, Smad3, p-Smad3, TGF-β₁ protein expressions in rat kidney tissue

4 讨论

真武汤出自张仲景所著《伤寒论》,一处是太阳病误治,阳虚水泛,证见发热、心悸、头眩、身瞤动;另一处是少阴病,证见腹痛、小便不利、四肢沉重疼痛、下利,或见咳嗽、呕吐^[15]。真武汤由茯苓、芍药、生姜、白术、炮附子五味药组成,具有温阳利水的功效。方中炮附子温肾阳、化水气;茯苓、白术健脾气、利水邪;生姜辛温宣散,佐附子助阳,于主水中有散水之意;芍药可益阴和营,制附、姜之烈性,还兼具活血化瘀、利小便的功效。本方温阳利水的同时,脾肾同调,补气活血,标本兼治。临床治疗慢性肾脏病,证见纳差、四肢乏力沉重、水肿、恶心呕吐等辨证为脾肾亏虚、阳虚水泛的病人,本方能很好改善临床症状,延缓疾病进程。实验研究表明,真

武汤能够抑制炎症细胞浸润,抑制 TGF-β₁^[17],核转录因子-κB^[18], ROS 等促纤维化信号因子,从而有效抑制 RIF 的进展^[19]。水蛭具有破血逐瘀的功效,其有效成分主要是水蛭素,现代药理学研究认为水蛭素是有效的凝血酶抑制剂,水蛭具有抗凝血、抗炎和抗纤维化的作用^[20]。黄芪有补气升阳、利尿消肿的功效,有效成分有黄芪多糖、氨基酸、黄芪皂苷、黄酮类等。研究表明,黄芪能减轻肾小管上皮细胞炎症反应,抗氧化、改善肾小球滤过屏障、抗 TGF-β₁的作用^[21-22]。水蛭、黄芪合剂经研究表明,能够抑制肾小球系膜细胞增殖,降解 ECM,抑制肾脏固有细胞凋亡,进而保护肾脏^[23-24]。综上所述,芪蛭真武汤具有温阳利水、益气活血的功效,临床上能够有效延缓慢性肾脏病的进展,本实验通过不同剂量的芪蛭真武汤干预 UUO 模型大鼠,探究该方对 UUO 大鼠肾间质纤维化的作用。

血液生化检测结果表明,模型组大鼠的肌酐、尿素氮值均明显高于假手术组,表明经 UUO 术后,肾功能可发生恶化,且随术后时间延长,肾功恶化加重。因输尿管结扎后,肾小管压力增大,激活 RASS 系统,加重肾脏缺血、缺氧,肾小球失代偿,滤过功能下降,最终影响肾脏功能。与模型组比较,各中药治疗组 SCr, BUN 均较低,说明芪蛭真武汤具有延缓肾脏功能恶化,保护肾功能的作用。24 h-Upro 结果表明, UUO 术后,模型组大鼠 24 h-Upro 明显增加。随输尿管结扎时间延长,管球失衡,肾小球毛细血管压力相对增加,尿蛋白可随之漏出,形成蛋白尿。而芪蛭真武汤高剂量组的 24 h-Upro 少

于模型组,表明高剂量的芪蛭真武汤可一定程度降低尿蛋白。已有研究表明,真武汤能够减少阿奇霉素肾病模型尿蛋白,及改善肾脏功能^[25];水蛭能够降低大鼠局灶阶段性肾小球硬化模型的尿蛋白、血肌酐水平^[26]。临床上许多医家,如姚木铭等^[27]在治疗肾脏病中,常使用不同剂量的黄芪,或配伍各类活性药、补益药等,往往具有改善蛋白尿、血尿、水肿及乏力等临床症状的作用。

肾间质纤维化的主要病理表现为肌成纤维细胞增殖,细胞外基质大量沉积,肾小管损伤和炎性细胞浸润。肾小管损伤主要表现为肾小管上皮细胞凋亡,肾小管周围毛细血管损伤^[28],肾小管周围毛细血管损伤引起肾组织血流、供氧减少,肾小管重吸收障碍,进而激活氧化应激反应和肾素-血管紧张素-醛固酮系统,加重水钠出溜和肾脏损伤。大量炎性因子能够激活各类促纤维化信号通路并加重氧化应激,加速肾间质纤维化的进展^[29]。本实验中,HE染色示,各手术组均可见不同程度炎性细胞浸润,部分肾小管扩张,部分肾小管萎缩、塌陷,出现纤维组织增生,即发生了纤维化改变。而各治疗组较模型组肾组织病变轻浅,说明经过中药治疗,可改善肾脏间质的病理损伤。Masson染色结果示,UUO术后出现不同程度的纤维组织增生,治疗组可见纤维组织区域性分布,而模型组可见弥漫性分布。计算胶原容积分数值示,UUO模型组大鼠CVF值明显大于假手术组,肾组织纤维组织增生最为严重;各治疗组大鼠CVF值较模型组降低,说明经中药治疗,可抑制肾脏纤维组织的增生。已有研究表明,真武汤能改善大鼠肾脏组织的肾间质纤维增生,肾小管扩张、塌陷,肾小管上皮细胞坏死等病理改变,延缓RIF的进程^[30]。本实验表明,芪蛭真武汤同样具有改善肾间质损伤,抑制纤维组织增生的作用。肌成纤维细胞能够产生大量ECM,是RIF的主要效应细胞^[6], α -SMA是该细胞的标记蛋白,故检测到 α -SMA即可表明肌成纤维细胞形成和增殖。细胞外基质具有多种成分,在肾间质纤维化的中,主要有间质性胶原蛋白,如I,II,III,IV型胶原;弹力蛋白;黏附性蛋白如FN,层粘连蛋白(LN)等;基质细胞蛋白;蛋白多糖和透明质酸素^[31]。在RIF的过程中,主要表现为胶原蛋白大量增生和聚集,由FN连接形成不易被降解的蛋白质聚合物。本实验中,各手术组 α -SMA,Col-I, FN的表达均明显增加,表明UUO术后,大鼠肾间质可出现肌成纤维细胞增殖及ECM聚集。各治疗组上述蛋白的表达较

模型组均降低,表明中药的干预能够抑制肌成纤维细胞增殖和活化,减少细胞外基质沉积,进而抑制肾间质纤维化的进展。

本实验中,TGF- β_1 ,p-Smad3的表达在模型组最多,而各治疗组表达较少,表明芪蛭真武汤的治疗能够抑制TGF- β_1 /Smads信号通路。NOX4的表达趋势与TGF- β_1 一致,研究表明,TGF- β_1 能够诱导NADPH氧化酶亚单位p67phox的表达,从而引起ROS的产生,二者具协同性^[12]。张鹏宇等^[32]在UUO模型大鼠的肾组织匀浆中发现氧化应激反应中脂质过氧化产物丙二醇明显升高,氧化应激反应可能是UUO模型肾间质纤维化的产生机制和加重因素。本实验治疗组中,NOX4表达较模型组减少,表明芪蛭真武汤能够一定程度抑制氧化应激反应的发生,从而抑制肾间质纤维化的发生和发展。

综上所述,芪蛭真武汤能够减少UUO大鼠的尿蛋白,保护肾脏功能,改善肾脏的病理损伤,抑制肾间质纤维化的形成,延缓慢性肾脏病的进展;其机制可能与抑制TGF- β_1 /Smads信号通路,抑制氧化应激反应有关。

[参考文献]

- [1] ZHANG L, WANG F, WANG L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey[J]. Lancet, 2012, 379(9818):815-822.
- [2] 陈香美,孙雪峰. 慢性肾脏病——全球及中国公共健康的严重挑战[J]. 中华内科杂志, 2008, 47(11): 885-886.
- [3] ZHAO X C, LIVINGSTON M J, LIANG X L, et al. Cell apoptosis and autophagy in renal fibrosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165:557-584.
- [4] HEWITT S M, SCHAEFER L. Renal fibrosis: common enemy of many origins [J]. J Histochem Cytochem, 2019, 67(9):621.
- [5] DEVOCELLE A, LECRU L, FRANCOIS H, et al. Inhibition of TGF-beta1 signaling by IL-15: a novel role for IL-15 in the control of renal epithelial-mesenchymal transition: IL-15 counteracts TGF-beta1-induced EMT in renal fibrosis [J]. Int J Cell Biol, 2019, doi:10.1155/2019/9151394.
- [6] GRANDE M T, LÓPEZ-NOVOA J M. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy [J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 5(6): 319-328.
- [7] ZEISBERG E M, POTENTA S E, SUGIMOTO H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via

- endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(12):2282-2287.
- [8] MATTHIAS M, YANAGITA M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2015, 87(2):1193-1205.
- [9] JIN Z, GU C, TIAN F, et al. NDRG2 knockdown promotes fibrosis in renal tubula epithelial cells through TGF- β_1 /Smad3 pathway [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 369(3):603-610.
- [10] ZHOU Q, ZHU L, ZHANG D, et al. Oxidative stress-related biomarkers in postmenopausal osteoporosis: a systematic review and Meta-analyses [J]. *Dis Markers*, 2016, doi:10.1155/2016/7067984.
- [11] NILSSON L, MADSEN K, KRAG S, et al. Disruption of cyclooxygenase type 2 exacerbates apoptosis and renal damage during obstructive nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309(12):F1035-F1048.
- [12] 刘小贤,周红娟,蔡龙,等. TGF- β_1 对大鼠腹膜间皮细胞 ROS 和 NADPH 氧化酶亚基 p67phox 表达的影响及黄芪的干预作用 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(1):8-11, 95.
- [13] JOHAR S, CAVE A C, NARAYANAPANICKER A, et al. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase [J]. *FASEB J*, 2006, 20(9):1546-1548.
- [14] OKAMURA D M, PASICHNYK K, LOPEZ-GUISA J M, et al. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 300(1):246-253.
- [15] 李金田,董正华. 伤寒论讲义 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2012:75-76, 194-195.
- [16] ZHOU T B, OU C, QIN Y H, et al. LIM homeobox transcription factor 1B expression affects renal interstitial fibrosis and apoptosis in unilateral ureteral obstructed rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(12):F1477-F1488.
- [17] 周波,宋立群,负捷,等. 真武汤对 UUO 模型大鼠肾小管损伤和肾间质纤维化影响的研究 [J]. *中医药学报*, 2014, 42(3):136-138.
- [18] MATTHIAS M, MOTOKO Y. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2015, 87(2):297-307.
- [19] SORESCU D, GRIENGLING K K. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure [J]. *Congest Heart Fail*, 2002, 8(3):132-140.
- [20] 袁红霞,张莉芹,马瑾,等. 水蛭药用成分及主要药理功效研究进展 [J]. *甘肃医药*, 2013, 32(4):270-273.
- [21] 肖敏,樊均明. 黄芪在肾脏疾病治疗中的作用机制 [J]. *西部医学*, 2009, 21(3):474-475.
- [22] 焦志娜,张昱. 黄芪治疗肾脏病机理研究进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2012, 10(22):155-157.
- [23] 王广洋,任现志. 黄芪、水蛭及其配方含药血清对大鼠肾小球系膜细胞 NF- κ B、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2015, 56(1):59-62.
- [24] 郑宏,翟文生,任现志,等. 黄芪、水蛭含药血清对大鼠肾小球系膜细胞产生 TGF- β_1 的影响 [J]. *天津医药*, 2007, 35(7):509-511.
- [25] 李亚丽,李志杰,张燕,等. 真武汤对阿霉素所致大鼠肾损伤的治疗作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(11):1994-2000.
- [26] 杨馨,刘娜,张佩青. 水蛭对 FSGS 大鼠肾脏 ECM 积聚影响的实验研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(10):891-893, 943-944.
- [27] 姚木铭,聂莉芳. 聂莉芳教授运用黄芪治疗慢性肾脏病经验研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2018, 19(6):473-475.
- [28] 樊彩斌,温端改,侯建全,等. 梗阻性肾病中肾小管周围毛细血管损伤的实验研究 [J]. *江苏医药*, 2008, 34(4):386-388, 433.
- [29] KRIETE A, MAYO K L. Atypical pathways of NF- κ B activation and aging [J]. *Exp Gerontol*, 2008, 44(4):250-255.
- [30] 邱模炎,姜岳,赵宗江,等. 真武汤抗大鼠肾间质纤维化作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17):177-180.
- [31] BINDER M J, MCCOOMBE S, WILLIAMS E D, et al. The extracellular matrix in cancer progression: role of hyaluronan proteoglycans and ADAMTS enzymes [J]. *Cancer Lett*, 2017, 385:55-64.
- [32] 张鹏宇,阮颖新,李春媚,等. 氧化应激对输尿管梗阻大鼠肾脏 TGF- β_1 及其受体表达的影响 [J]. *吉林大学学报:医学版*, 2009, 35(3):400-405.

[责任编辑 周冰冰]