黄芪-丹参药对干预梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化的研究

李均*，曹轶璇，王冬，阳小敏，周萍
（遵义医学院第五附属（珠海）医院，广东 珠海 519100）

［摘要］ **目的**：观察黄芪-丹参药对及其组分对单侧输尿管梗阻（UUO）大鼠肾组织 α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、上皮型钙黏蛋白（E-cadherin）表达的影响，分析其对肾小管上皮细胞的干预作用。**方法**：66 只 SD 大鼠随机分为 7 组，正常组、模型组、Fosinopril 组、丹参总酚酸组、黄芪总皂苷组、黄芪-丹参颗粒剂配伍组、黄芪-丹参组分配伍组。造模后第 2 天各组按剂量给予相应药物 ig 治疗 14 d。福辛普利组按 6.6 mg·kg^{-1}给药，丹参总酚酸组按 40 mg·kg^{-1}给药，黄芪总皂苷组按 37.5 mg·kg^{-1}给药，黄芪丹参组分配伍组中黄芪总皂苷、丹参总酚酸分别按 37.5 mg·kg^{-1}和 40 mg·kg^{-1}给药，黄芪丹参颗粒剂组黄芪、丹参颗粒均按 10 g·kg^{-1}给药，第 15 天腹主动脉采血检测肾功能（肌酐、尿素氮）检测及代谢笼收集尿液测定视黄醇结合蛋白（RBP）水平。免疫组化染色，光学显微镜下观察肾组织 α-SMA，E-cadherin 表达变化。**结果**：肾功能结果分析显示，UUO 组大鼠术后血清 Cr 达（52.34 ± 7.63）μmol·L^{-1}，显著高于正常组（43.29 ± 4.13）μmol·L^{-1}（$P < 0.05$），但除福辛普利组外，各给药组大鼠 Cr 水平与模型组相比差异无统计学意义。各组大鼠血清 BUN 水平差异无统计学意义；各造模组大鼠尿 RBP 水平较正常组显著升高（$P < 0.05$），其中，福辛普利组、组分配伍组大鼠尿 RBP 分别为（0.41 ± 0.05），（0.41 ± 0.04）μmol·L^{-1}，与模型组（0.49 ± 0.09）μmol·L^{-1}相比有显著性差异（$P < 0.05$）。免疫组化结果均以模型组病变最严重；病变最轻的为福辛普利组及组分配伍组。**结论**：黄芪丹参药对及其有效成分对 UUO 大鼠肾功能、肾小管功能有一定的保护作用，其机制可能与其通过减少模型鼠肾组织 α-SMA 表达，增加 E-cadherin 表达，干预肾小管上皮细胞转分化而防治肾间质纤维化有关。

［关键词］ 肾纤维化；黄芪；丹参；α-平滑肌肌动蛋白；上皮型钙黏蛋白
［中图分类号］ R285.5 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2011)19-0195-04
［DOI］ CNKI:11-3495/R.20110809.1704.006 ［网络出版时间］ 2011-08-09 17:04
［网络出版地址］ http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1704.006.html

Effect of Herbal Pair of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma on Expression of α-Smooth Muscle Actin and E-cadherin in Ureteral Urinary Obstructive Rat Kidney

*LI Jun**, *CAO Yi-xuan*, *WANG Dong*, *YANG Xiao-min*, *ZHOU Ping*
(*The Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College in Zhuhai*, *Zhuhai* 519000, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To observe effect of effective constituents of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma on the expression of α-SMA and E-cadherin in UUO rat kidney. **Method**: Sixty-six SD rats were randomly divided into 7 groups, normal group, model group, fosinopril group, salvianolic acids group, astragalus saponins group, granules combination of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma group, constituents combination of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma group. Each group was treated with different does of drugs after UUO surgery for 14 days. The doesage of fosinopril group was 6.6 mg·kg^{-1}, salvianolic acids group was 40 mg·kg^{-1}, astragalus saponins group was 37.5 mg·kg^{-1}, constituents

［收稿日期］ 20110117(006)
［基金项目］ 国家自然科学基金项目(30960490)；贵州省社会攻关项目(黔科合 SY 字[2009]3078)；贵州省省长基金项目黔省专合字(2010)69
［通讯作者］ *李均，主任医师，医学博士，主要从事中医药防治慢性肾脏病的研究，Tel:13928038553，E-mail:lijun69-1214@163.com

combination of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma group was given salvianolic acids 40 mg·kg^{-1} and astragalus saponins group was 37.5 mg·kg^{-1}, granules combination of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma group was given Astragali Radix granules and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma granules 10 g·kg^{-1}. Blood was withdrawn from abdominal aortic to determine the renal function (creatinine, urea nitrogen) and metabolic cages were used to collect urine for retinol binding protein (RBP) determination, the obstructed kidney was taken out and fixed by 10% paraform and made into paraffin section by dehydration and embedding which were used for immunohistochemistry experiment. **Result**: The level of serum Cr in UUO rats reached (52.34 ± 7.63) μmol·L^{-1}, was higher than that of (43.29 ± 4.13) μmol·L^{-1} in the normal group, however, except fosinopril, there was no significant difference between the treatment group and the model group No significant differences were found in the serum BUN. The standard of urinary RBP expression in every UUO group was significantly higher than normal group ($P < 0.05$), compared with the model group that its figure was (0.49 ± 0.09) μmol·L^{-1}, the fosinopril group and constituents group RBP levels were (0.41 ± 0.05), (0.41 ± 0.04) μmol·L^{-1}, of which had obvious significance ($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that the most severely pathological changes was in the model group, the lightest pathological changes were found in fosinopril group and the group with constituents combination of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma. **Conclusion**: Renal function has been damaged in UUO rats, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma effective constituents and their combination could ameliorate renal function and reduce the expression of tubular protein RBP in urine. Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and their active constituents intervention could alleviate renal fibrosis at a certain degree.

[**Key words**] renal fibrosis; Astragali Radix; Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; α-smooth muscle actin; E-cadherin

肾间质纤维化、肾小球硬化和肾血管硬化是慢性肾脏病发展为终末期肾病的主要病理基础，是临床加重慢性肾衰进程的重要环节。中医药延缓肾纤维化的临床与实验研究，均显示了良好的抗纤维化作用，具有多成分与多作用途径的特点并取得了较大进展[1]。但中药复方制剂因药物较多，虽然有很好的抗肾纤维化疗效，但难以阐明其作用机制、有效药物组分及药物在体内的作用过程。单用中药有效组分进行研究，又脱离了中医理论的指导。而中药药对及其有效组分配伍则能弥补二者研究的不足，既可结合中医病理机制，又是中药复方制剂的构成基础、且能阐明其起作用的成分。课题组采用肾纤维化单侧输尿管梗阻(UUO)模型造成肾间质损害及肾纤维化，观察了临床最常用防治慢性肾纤维化的黄芪丹参药对及其有效组分对大鼠 UUO 肾组织 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)表达的影响，以揭示其防治慢性肾纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级、健康 SD 大鼠及 SPF 实验室由广东省医学实验动物中心提供，体重 180 ~ 220 g。许可证号 SCKK(粤)2008-0002。

1.2 药物与试剂 黄芪、丹参颗粒由江阴天江药业出品(批号分别为 0912089，1001001)，黄芪总皂苷(纯度 98%)、丹参总酚酸(纯度 98%)购买自陕西省森弗生物技术有限公司(批号分别为 SFHQ100427，SFDS100430)。福辛普利钠片由中美上海施贵宝制药有限公司生产(批号 1001091)。尿素氮(BUN)检测试剂盒，Roche，批号 62098501，肌酐(CR)检测试剂盒，Roche，批号 62154001。大鼠视黄醇结合蛋白(RBP)酶联免疫分析试剂盒，CUSABIO 生产，批号 C17010123。兔抗大鼠 α-SMA 多克隆抗体购自北京博奥森(批号 bs-0189R)，兔抗大鼠 E-cadherin 多克隆抗体购自武汉博士德公司(批号 BA0475)。

1.3 仪器 Roche P800 型全自动生化分化分析仪，HPIAS-1000 计算机图像自动分析系统，ELX800 型全自动酶标检测仪，BIO ~ TEK，美国。

2 方法

2.1 造模方法及分组给药 根据文献方法建立大

鼠肾间质纤维化模型[2]。以3%戊巴比妥钠2 mL·kg^{-1} ip麻醉,固定大鼠,消毒,在距脊柱约1~1.5 cm肋缘下做长约1~1.5 cm纵行切口,逐层切开,找到右输尿管,分离输尿管,取中段结扎,逐层缝合,关闭腹腔,再次消毒切口,无菌敷料覆盖包扎。造模后随机分为6组,第2天开始给药,药物用生理盐水配置成相应浓度,使给药体积为10 mL·kg^{-1},ig 14 d:黄芪-丹参药对颗粒配伍组(黄芪颗粒、丹参颗粒分别以10 g·kg^{-1}剂量给药);黄芪-丹参药对组分配伍组(黄芪总皂苷和丹参总酚酸分别为37.5 mg·kg^{-1}和40 mg·kg^{-1},下简称组分配伍组);丹参总酚酸组(丹参总酚酸40 mg·kg^{-1});黄芪总皂苷组(黄芪总皂苷37.5 mg·kg^{-1});福辛普利组(福辛普利6.6 mg·kg^{-1});模型组自由进食和给予等量蒸馏水ig。

2.2 观察指标

2.2.1 肾功能 UUO术后第15天腹主动脉采血,采用全自动生化分析仪检测大鼠血清肌酐和尿素氮。

2.2.2 肾小管功能 代谢笼收集尿液,采用ELISA法检测大鼠尿RBP。

2.2.3 肾组织α-SMA,E-cadherin表达及半定量分析[3] UUO术后第16天处死大鼠,取梗阻侧肾脏,取肾组织1/2用10%福尔马林固定,经包埋、脱水处理,切成3 μm切片。严格按照免疫组织化学操作流程及抗体说明书进行。α-SMA稀释浓度为1∶50、兔抗大鼠E-cadherin为即用型,采用PBS作阴性对照。

免疫组化阳性结果为细胞质及肾间质染成棕黄色或黄色颗粒,采用HPIAS-1000计算机图像自动分析系统对各组图像进行分析,每张切片在400倍视野下随机取5个视野,计算每个视野的平均灰度级,分为0~255级共256级,平均灰度值越高,表明其透光率越强,免疫组化染色越浅,阳性率越低。

2.3 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件分析所得数据,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,LSD法多重比较组间差异。以 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

3 结果

3.1 肾功能检测 与正常组相比,模型组及各治疗组血清Cr水平均显著高于正常组($P<0.05$),而各组间血清BUN水平无显著差异,说明UUO大鼠肾功能出现损害。与模型组比较,福辛普利组对照组血清Cr水平均明显降低($P<0.05$),其余各治疗组血清Cr水平虽然有下降趋势,但与模型组比较统计学上差异均无显著性。见表1。

表1 黄芪-丹参药对及有效组分对UUO大鼠血清Cr,BUN的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg^{-1}	Cr/μmol·L^{-1}	BUN/mmol·L^{-1}
正常	8	-	43.29±4.13	6.39±0.97
模型	8	-	52.34±7.63[1)]	7.19±1.65
福辛普利	10	6.6	42.83±7.32[2)]	6.02±1.30
颗粒配伍	10	$1\times10^4+1\times10^4$	50.91±8.98[1)]	7.01±1.13
组分配伍	10	37.5+40	52.48±7.70[1)]	6.55±1.44
丹参总酚酸	10	40	47.45±4.11	7.10±1.10
黄芪总皂苷	10	37.5	51.47±9.79[1)]	7.12±0.85

注:与正常组比较[1)] $P<0.05$;与模型组比较[2)] $P<0.05$(表2~3同)。

3.2 尿RBP检测 与正常组比较,模型组、颗粒配伍组、丹参总酚酸组、黄芪总皂苷组UUO大鼠尿RBP水平明显升高($P<0.05$)。组分配伍组及福辛普利尿RBP水平显著低于模型组($P<0.05$)。与模型组比较,颗粒配伍组、丹参总酚酸组、黄芪总皂苷组RBP水平有下降趋势,但统计学上差异无显著性。见表2。

表2 黄芪丹参药对及有效组分对UUO大鼠尿RBP的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg^{-1}	RBP/μmol·L^{-1}
正常	8	-	0.36±0.02
模型	8	-	0.49±0.09[1)]
福辛普利	10	6.6	0.41±0.05[2)]
颗粒配伍	10	$1\times10^4+1\times10^4$	0.47±0.06[1)]
组分配伍	10	37.5+40	0.41±0.04[2)]
丹参总酚酸	10	40	0.45±0.07[1)]
黄芪总皂苷	10	37.5	0.46±0.07[1)]

3.3 大鼠肾组织α-SMA,E-cadherin蛋白的表达

3.3.1 大鼠肾组织α-SMA蛋白的表达 与正常组相比较,模型组大鼠肾组织α-SM*A*灰度值显著低于正常组($P<0.05$)。与模型组比较,福辛普利组、丹参总酚酸组、组分配伍组肾组织α-SMA表达平均灰度值均明显升高($P<0.05$),其余各治疗组α-SMA平均灰度值虽然有升高趋势,但与模型组比较,统计学上差异均无显著性。其中,丹参总酚酸组、组分配伍组肾组织α-SMA水平与福辛普利组比较,无显著性差异。

3.3.2 大鼠肾组织E-cadherin蛋白的表达 与正常组相比,模型组肾组织E-cadherin表达的平均灰度值显著高于正常组($P<0.05$)。与模型组比较,

福辛普利组、丹参总酚酸组、黄芪总皂苷组、颗粒配伍组、组分配伍组肾组织 E-cadherin 表达平均灰度值明显降低($P<0.05$),其阳性强度明显增强,与福辛普利组比较,无显著性差异。其余各治疗组虽然有降低趋势,但与模型组比较,统计学上差异均无显著性。见表 3。

表 3 黄芪-丹参药对及有效组分对 UUO 大鼠肾组织 α-SMA, E-cadherin 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg^{-1}	平均灰度值	
		α-SMA	E-cadherin
正常	-	127.96±43.20	28.22±11.07
模型	-	69.81±32.38[1)]	123.23±36.70[1)]
福辛普利	6.6	110.16±36.89[2)]	46.57±19.45[2)]
颗粒配伍	$1\times10^4+1\times10^4$	95.48±38.43	65.59±17.54[1,2)]
组分配伍	37.5+40	109.96±28.90[2)]	45.94±19.76[2)]
丹参总酚酸	40	108.90±36.52[2)]	61.13±18.06[1,2)]
黄芪总皂苷	37.5	83.31±17.56[1)]	50.36±11.62[2)]

4 讨论

中药黄芪是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪干燥根,丹参为唇形科植物丹参干燥根茎,二者配伍具有补气活血功效,可以针对肾纤维化气虚血瘀的基本病机,因而广泛应用于慢性肾脏病的临床。研究表明,黄芪和丹参的抗肾纤维化的有效成分主要涉及黄芪多糖、黄芪皂苷、丹参总酚酸、丹参酚酸 B、丹参酮等多种[4],其研究结果揭示了单分子治疗药物的药效机制,但未发现有黄芪丹参药对及其有效成分配伍防止肾纤维化的研究。新近研究提示:中药有效组分配伍是中药配伍的新模式,该模式可以显著提高疗效,有利于促进中药内涵现代化[5]。本实验建立单侧输尿管梗阻模型,发现模型组大鼠血肌酐、尿 RBP 明显较正常组升高,经过黄芪丹参药对及其组分的干预,发现黄芪丹参药颗粒配伍组可降低 UUO 模型大鼠血肌酐,改善肾功能,组分配伍组可降低模型大鼠尿 RBP,保护肾小管功能作用。

肾小管上皮细胞向间充质细胞转化(EMT)在肾纤维化中的作用日益受到重视。在纤维化的肾脏中 14%~15% 成纤维细胞来自于骨髓,36% 来自于 EMT[6]。研究发现 α-SMA 在肾脏局部的表达高低可以间接反映肌成纤维细胞的数量[7-8]。肾小管上皮细胞通过不同的细胞黏附机制紧密连接在一起,E-钙依赖性黏附素是一种特异的黏附分子受体,它对维持肾小管上皮细胞结构和功能的完整性起关键作用,表达的下调将可能导致肾小管上皮细胞完整性破坏,细胞失去极性而发生迁移[9-10],并最终导致纤维化的发生。

本研究结果提示:黄芪丹参药对及其有效组分对 UUO 大鼠肾小管功能具有一定的保护作用,以组分配伍组效果明显,其机制可能与降低肾组织 α-SMA的表达,增强 E-钙依赖性黏附素表达有关。

[参考文献]

[1] 何立群. 丹酚酸 B 对马兜铃酸诱导的大鼠肾纤维化的拮抗研究[J]. 上海中医药杂志,2007,42(7):3.

[2] 胡绍进,李均,李莹莹,等. 温阳活血方对单侧输尿管梗阻大鼠 Smad 7 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(3):232.

[3] 马洪波,路群,张木勋. 苯那普利对糖尿病大鼠肾组织中 MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响[J]. 中国微循环,2003,7(2):85.

[4] 李均,曹轶璇. 黄芪丹参有效组分及其配伍抗肾纤维化的体内研究进展[J]. 中国中西医结合肾脏病杂志,2010,11(9):841.

[5] 苗明三,马霄,王灿. 中药有效组分配伍探讨[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(5):487.

[6] 辛冰牧,杨红振,胡卓伟. 肾纤维化发病机制及治疗学研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(5):349.

[7] 王宁宁,王笑云,毛慧娟,等. 小鼠肾组织中 SnoN 蛋白表达水平与肾小管上皮细胞转分化的关系[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2006,15(1)25.

[8] 方芳,吴永贵,董婧,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾小管-间质损伤的保护作用及机制[J]. 中国药理学通报,2008,24(3):369.

[9] 陆海英,张悦,刘煜敏,等. α-滑肌肌动蛋白和 E-钙依赖性黏附素在肾间质纤维化大鼠肾组织中的表达[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(4):795.

[10] Aresu L, Rastaldi M P, Pregel P, et al. Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis[J]. Virchows Arch,2008,453(6):617.

[责任编辑 聂淑琴]