

· 药理 ·

# 益气活血降浊复方对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号传导通路的影响

刘晓倩<sup>1</sup>, 赵宗江<sup>2</sup>, 闫军堂<sup>2</sup>, 刘文军<sup>1\*</sup>, 杨美娟<sup>2</sup>, 宗妍<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **[摘要]** **目的:**研究益气活血降浊复方对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾组织转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta_1$ ), smad7, p-smad2/3, 整合素连接激酶(ILK)蛋白表达, 观察其对 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号传导通路的影响。**方法:**132 只雄性 SD 大鼠以单侧输尿管结扎术建立肾间质纤维化动物模型, 造模成功后大鼠随机分为正常组, 假手术组, 模型组, 西药组, 益气活血降浊复方高、中、低剂量组。根据大鼠体重确定具体给药剂量, 益气活血降浊组高剂量组  $34.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 中剂量组  $17.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 低剂量组  $8.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (分别为人服用量的 20, 10, 5 倍), ig 给药, 1 次/d, 模型组和假手术组、正常组灌入相应生理盐水。福辛普利钠  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (相当于成人用量的 20 倍)。考马斯亮蓝法测 24 h 尿蛋白定量; 采用免疫组化方法检测肾组织中 TGF- $\beta_1$ , smad7, p-smad2/3, ILK 蛋白表达。**结果:**与正常组、假手术组相比, 模型组大鼠第 1, 2, 3 周肾间质中 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3 以及 ILK 蛋白表达明显增多 ( $P < 0.01$ ), 正常组肾间质中均有较弱的表达, 益气活血降浊复方高、中、低剂量组较正常组、假手术组在各个时间点 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3 以及 ILK 蛋白表达有所增加, 但与模型组比较显著降低 ( $P < 0.01$ ), 西药福辛普利钠组较模型组表达也显著减少 ( $P < 0.01$ )。益气活血降浊高剂量组在各个时间点降低 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, ILK 蛋白效果最好且与西药组相当, 中、低剂量组虽然能降低 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, ILK 蛋白, 但和高剂量组和西药组存在差异。而模型组大鼠在第 1, 2, 3 周肾间质 smad7 蛋白表达较正常组、假手术组明显减少 ( $P < 0.01$ ), 正常组肾间质中均有较强的表达, 益气活血降浊复方高、中、低剂量组较正常组、假手术组在各个时间点 smad7 蛋白表达有所减少, 但与模型组比较显著增加 ( $P < 0.01$ )。**结论:**益气活血降浊复方通过抑制 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, ILK 表达, 上调 smad7 的表达, 影响 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号传导通路, 抑制肾间质纤维化的发展。

**[关键词]** 肾间质纤维化; 益气活血降浊复方; 转化生长因子- $\beta_1$ -smad-整合素连接激酶; 信号转导通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0149-05

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110721.1732.001 **[网络出版时间]** 2011-07-21 17:32

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110721.1732.001.html>

## Influence of Yiqi Huoxue Jiangzhuo Decoction on TGF- $\beta_1$ -smad-ILK Signal Transduction Pathway in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction

LIU Xiao-qian<sup>1</sup>, ZHAO Zong-jiang<sup>2</sup>, YAN Jun-tang<sup>2</sup>, LIU Wen-jun<sup>1\*</sup>, YANG Mei-juan<sup>2</sup>, ZONG Yan<sup>2</sup>

(1. Guanganmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study Yiqi Huoxue Jiangzhuo decoction (YHJD) on transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta_1$ ), smad7, p-smad2/3, integrin-linked kinase (ILK) protein expressions, and investigate the effect

**[收稿日期]** 20110306(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873251)

**[第一作者]** 刘晓倩, 在读硕士研究生, 从事中医药防治肾间质纤维化的临床及实验研究, Tel: 15120012689, E-mail: liuxiaoqian106@126.com

**[通讯作者]** \* 刘文军, 教授, 主任医师, 硕士生导师, Tel: 13671280046, E-mail: liuwenjunlyzh@sina.com

of YHJD on TGF- $\beta_1$ -smad-ILK signal transduction pathway. **Method:** Unilateral ureteral obstruction (UUO) method was adopted to establish rat model of renal interstitial fibrosis, one hundred and thirty-two SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, western medicine group, YHJD large, medium and low-dose group. Coomassie brilliant blue method was used to measure 24 h urinary protein. The protein expression of TGF- $\beta_1$ , smad7, p-smad2/3, ILK in kidney tissue were detected respectively by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the normal group and sham operation group, TGF- $\beta_1$ , p-smad2, 3, and ILK protein expressions in kidney tissue in the model group were significantly increased at 1, 2, 3 weeks ( $P < 0.01$ ), there were weak expressions of TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, and ILK protein in normal group. TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, and ILK protein expressions in YHJD large, medium, low-dose groups were increased compared with those in the normal group and sham operation group at each time point. However, compared with the model group they were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), fosinopril sodium group was also significantly reduced than in model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** YHJD could block TGF- $\beta_1$ -smad-ILK signal transduction by reducing TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, ILK protein expressions and increasing smad7 proteins expression in kidney tissue. It might be the mechanisms of YHJD relieving renal interstitial fibroblast.

[**Key words**] renal interstitial fibrosis; Yiqi Huoxue Jiangzhuo decoction; TGF- $\beta_1$ -smad-ILK signal transduction pathway

肾间质纤维化是几乎所有慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD), 包括原发性、继发性肾小球疾病, 肾小管、间质及血管疾病发展至终末期肾脏病的最后共同通路<sup>[1]</sup>。其主要病理改变为正常肾单位的丢失, 取而代之以大量成纤维细胞及肌成纤维细胞的增生, 细胞外基质如胶原纤维和纤粘连蛋白的产生和堆积而导致肾小球硬化、肾小管间质纤维化, 最终导致肾脏功能的丧失。针对肾间质纤维化的病理特征和病变发生的分子生物学机制, 一些抗纤维化的新对策, 如抑制或清除促纤维化因子是行之有效的治疗原则, 其中最受关注的是抑制转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 表达和拮抗其信号传导。TGF- $\beta$  被认为是肾脏纤维化发生、发展的关键因子; smads 蛋白是目前所知的 TGF- $\beta$  受体唯一的胞内信号转导, TGF- $\beta$ /smad 信号通路是肾间质纤维化主要的最终共同通路。整合素连接激酶 (ILK) 则参与了 TGF- $\beta_1$ /smad 信号通路和激活下游因子的活动, 进而在 TGF- $\beta_1$  介导肾小管上皮细胞转分化 (EMT) 过程中扮演重要角色, 在肾间质纤维化的发生发展中起关键作用<sup>[2]</sup>。肾间质纤维化是一个多细胞参与的复杂过程, 特异性阻断某些关键环节, 有可能阻止肾纤维化的发生和发展, 从而达到治疗目的。

益气活血降浊复方针对肾间质纤维化脾肾亏虚为本, 瘀血水停为标的病机, 治以益气活血, 健脾利水兼以泻浊解毒, 可有效保护肾功能, 临床效果良

好。本实验以单侧输尿管结扎术建立大鼠肾间质纤维化动物模型, 观察益气活血降浊复方对 UUO 大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ , smad7, p-smad2/3, 以及 ILK 蛋白表达的影响, 探讨益气活血降浊复方对 UUO 大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号传导通路的影响, 进一步探讨其抗肾间质纤维化的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠 132 只, 体重 (200  $\pm$  10) g, 由北京维通利华实验动物中心提供, 置于洁净级动物房洁净动物橱中饲养。饲料为北京维通利华动物实验中心提供的固体全价饲料, 饮用水为自来水, 实验期间自由饮水和进食。

**1.2 药物** 福辛普利钠由中美上海施贵宝制药有限公司生产 (批号 0908086), 由我院制剂室制成混悬液。益气活血降浊复方组成: 生黄芪 20 g, 当归 15 g, 川芎 10 g, 赤芍 10 g, 柴胡 6 g, 黄芩 10 g, 土茯苓 30 g, 生大黄 10 g 等。实验所用中药制剂均由广安门医院制剂室按既定工艺经水提醇沉得生药 4.8 g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 提取液 (批号 20091012)。

**1.3 试剂** TGF- $\beta_1$  (Santa cruz biotechnology, INC. sc-146); smad7 (兔抗鼠多克隆抗体, 批号 bs-0566R); P-smad2/3 (Santa cruz biotechnology, INC. sc-11769); ILK (Eptimics, EP1593Y); 免疫组化二抗试剂盒 (北京博奥森, sp-0023); DAB 试剂盒 (北京优尼康, 目录号 DA1010)。

## 2 方法

**2.1 模型制备与分组** 将雄性 SD 大鼠 132 只随机分成 3 组:正常组、造模组以及假手术组,造模组行单侧输尿管结扎手术致肾间质纤维化模型<sup>[3]</sup>,10%水合氯醛 ip 麻醉,暴露右侧肾脏。用镊子分离输尿管,两端结扎,中间剪断输尿管,最后纳肾于原位。假手术组处理:打开大鼠腹腔后,用镊子分离输尿管,然后纳肾于原位。造模成功后,除去死亡大鼠,再将大鼠分成模型组,西药福辛普利钠 10 mg·kg<sup>-1</sup>组(相当于成人用量的 20 倍),益气活血降浊复方高、中、低剂量组(34.6,17.3,8.6 g·kg<sup>-1</sup>,分别为人服用量的 20,10,5 倍)ig 给药,1 次/d,模型组和假手术组、正常组 ig 相应生理盐水。分别于术后 7,14,21 d 麻醉后处死大鼠 6 只,肾组织部分行 10% 福尔马林固定,其余液氮中保存。

### 2.2 观察方法与指标

**2.2.1 尿蛋白定量测定** 实验第 1,2,3 周分别用代谢笼收集 24 h 尿液,记录尿量,用考马斯亮蓝法测量 24 h 尿蛋白定量。

**2.2.2 免疫组化方法** 检测肾组织中 TGF- $\beta_1$ , smad7, p-smad2/3, 以及 ILK 蛋白表达。

**2.3 免疫组化实验方法** 免疫组化组织显色采用 SABC 法<sup>[4]</sup>,根据预实验结果,确定一抗的稀释浓度,每个抗体均用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 代替一抗做阴性对照,切片常规脱蜡至水;0.01% 曲拉通 15 min 37 °C;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇 20 min;微波修复 90 °C ~98 °C 15 min;山羊血清封闭 20 min;滴加一抗(TGF- $\beta_1$  浓度 1:100, smad7 浓度 1:200, p-smad2/3 浓度 1:50, ILK 浓度 1:100),4 °C 过夜;滴加 B 液,37 °C 保湿盒中孵育 30 min;加入 C 液,37 °C 保湿盒中孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染,封片镜检。

**2.4 图像分析** 根据染色染料颜色的深浅[吸光度(A)]及分布面积大小来确定目标蛋白量。染色区

域分布面积与目标蛋白量成正比,染色的颜色深浅(A)与目标蛋白量的定量关系符合朗伯-比尔定律,是对数关系。采用 Image-Pro Plus 软件对图像进行分析,每张切片随机取至少 5 个视野,图像分析比较各组 A。

**2.5 统计分析** 所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 24 h 尿蛋白定量测定** 与模型组相比,造模后第 2 周益气活血降浊复方低、高剂量组有明显降低( $P < 0.05$ ),中剂量组有极显著降低( $P < 0.01$ );第 3 周时,益气活血降浊复方 3 个剂量组与模型组比较均有极显著差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 益气活血降浊复方对 UUO 大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) mg/24 h

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	尿蛋白定量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) mg/24 h		
		第 1 周	第 2 周	第 3 周
正常	-	2.62 ± 0.60 <sup>2)</sup>	2.89 ± 0.56 <sup>2)</sup>	2.92 ± 0.30 <sup>2)</sup>
假手术	-	4.17 ± 1.23	4.88 ± 0.71	5.07 ± 0.78 <sup>2)</sup>
模型	-	5.82 ± 0.60	6.88 ± 1.12	10.11 ± 1.77
福辛普利钠	1 × 10 <sup>-2</sup>	4.86 ± 0.26	5.14 ± 0.77	4.31 ± 0.70 <sup>2)</sup>
益气活血降浊方	8.6	4.19 ± 0.67	4.28 ± 0.84 <sup>1)</sup>	4.16 ± 0.92 <sup>1)</sup>
	17.3	4.07 ± 0.39	4.12 ± 0.42 <sup>2)</sup>	4.36 ± 0.34 <sup>2)</sup>
	34.6	4.16 ± 0.63	4.35 ± 0.13 <sup>1)</sup>	5.24 ± 0.83 <sup>2)</sup>

注:与模型组相比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

**3.2 肾组织 TGF- $\beta_1$ , smad7, p-smad2/3, 以及 ILK 蛋白表达**

**3.2.1 肾组织 TGF- $\beta_1$  蛋白表达** 模型组大鼠在第 1,2,3 周肾小管上皮细胞的胞浆中 TGF- $\beta_1$  蛋白较正常组、假手术组明显增多( $P < 0.01$ ),益气活血降浊复方高、中、低剂量组较模型组在各个时间点 TGF- $\beta_1$  蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),福辛普利钠组较模型组表达也显著减少( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 益气活血降浊复方对 UUO 各组 TGF- $\beta_1$  蛋白含量的比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	TGF- $\beta_1$		
		第 1 周	第 2 周	第 3 周
正常	-	0.010 6 ± 0.001 3 <sup>2)</sup>	0.011 9 ± 0.002 0 <sup>2)</sup>	0.011 ± 0.002 4 <sup>2)</sup>
假手术	-	0.018 9 ± 0.001 8 <sup>2)</sup>	0.020 4 ± 0.001 8 <sup>2)</sup>	0.012 5 ± 0.001 7 <sup>2)</sup>
模型	-	0.170 8 ± 0.007 1	0.189 9 ± 0.036 0	0.203 7 ± 0.015 9
福辛普利钠	1 × 10 <sup>-2</sup>	0.041 4 ± 0.002 8 <sup>2)</sup>	0.025 7 ± 0.003 5 <sup>2)</sup>	0.050 7 ± 0.009 7 <sup>2)</sup>
益气活血降浊方	8.6	0.092 5 ± 0.004 6 <sup>2)</sup>	0.084 8 ± 0.006 6 <sup>2)</sup>	0.067 4 ± 0.005 5 <sup>2)</sup>
	17.3	0.070 8 ± 0.003 5 <sup>2)</sup>	0.071 1 ± 0.008 0 <sup>2)</sup>	0.074 1 ± 0.005 4 <sup>2)</sup>
	34.6	0.028 1 ± 0.001 9 <sup>2)</sup>	0.022 4 ± 0.002 8 <sup>2)</sup>	0.027 4 ± 0.004 1 <sup>2)</sup>

**3.2.2 肾组织 p-smad2,3 蛋白表达** 模型组大鼠在第 1, 2, 3 周肾小管上皮细胞的细胞核中 p-smad2/3 蛋白较正常组、假手术组明显增多 ( $P < 0.01$ ), 正常组肾间质中均有较弱的表达, 益气活血

降浊复方高、中、低剂量组较模型组比较显著降低 ( $P < 0.01$ ), 西药组较模型组表达也显著减少 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 益气活血降浊复方对 UUO 各组 p-smad2/3 吸光度的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	p-smad2/3		
		第 1 周	第 2 周	第 3 周
正常	-	0.026 6 ± 0.001 9 <sup>2)</sup>	0.024 2 ± 0.001 7 <sup>2)</sup>	0.018 4 ± 0.003 4 <sup>2)</sup>
假手术	-	0.028 9 ± 0.002 8 <sup>2)</sup>	0.028 ± 0.004 5 <sup>2)</sup>	0.027 1 ± 0.003 9 <sup>2)</sup>
模型	-	0.205 3 ± 0.009 1	0.222 ± 0.032 7	0.169 6 ± 0.022 3
福辛普利钠	10	0.029 4 ± 0.002 5 <sup>2)</sup>	0.030 4 ± 0.008 1 <sup>2)</sup>	0.057 9 ± 0.004 7 <sup>2)</sup>
益气活血降浊方	8.6	0.132 9 ± 0.008 9 <sup>2)</sup>	0.112 3 ± 0.009 8 <sup>2)</sup>	0.103 0 ± 0.013 3 <sup>2)</sup>
	17.3	0.047 3 ± 0.003 7 <sup>2)</sup>	0.069 5 ± 0.005 3 <sup>2)</sup>	0.066 4 ± 0.006 9 <sup>2)</sup>
	34.6	0.029 9 ± 0.002 4 <sup>2)</sup>	0.031 6 ± 0.001 8 <sup>2)</sup>	0.065 1 ± 0.009 4 <sup>2)</sup>

**3.2.3 肾组织 smad7 蛋白表达** 模型组大鼠在第 1, 2, 3 周肾小管上皮细胞的胞浆中 smad7 蛋白较正常组、假手术组明显减少 ( $P < 0.01$ ), 正常组肾间质

中均有较强的表达, 益气活血降浊复方高、中、低剂量组较模型组比较显著增加 ( $P < 0.01$ ), 西药组较模型组表达也显著增加 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 益气活血降浊复方对 UUO 各组 smad7 蛋白吸光度的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	smad7		
		第 1 周	第 2 周	第 3 周
正常	-	0.296 7 ± 0.005 4 <sup>2)</sup>	0.256 7 ± 0.004 6 <sup>2)</sup>	0.275 6 ± 0.004 9 <sup>2)</sup>
假手术	-	0.277 1 ± 0.006 8 <sup>2)</sup>	0.252 2 ± 0.005 7 <sup>2)</sup>	0.266 2 ± 0.006 9 <sup>2)</sup>
模型	-	0.161 8 ± 0.010 4	0.099 7 ± 0.019 6	0.084 4 ± 0.003 5
福辛普利钠	1 × 10 <sup>-2</sup>	0.222 ± 0.008 3 <sup>2)</sup>	0.227 8 ± 0.005 2 <sup>2)</sup>	0.218 ± 0.007 2 <sup>2)</sup>
益气活血降浊方	8.6	0.172 1 ± 0.004 3 <sup>2)</sup>	0.157 5 ± 0.015 6 <sup>1)</sup>	0.107 5 ± 0.007 8 <sup>1)</sup>
	17.3	0.235 ± 0.010 2 <sup>2)</sup>	0.221 4 ± 0.004 7 <sup>2)</sup>	0.190 6 ± 0.003 2 <sup>2)</sup>
	34.6	0.233 1 ± 0.006 8 <sup>2)</sup>	0.225 8 ± 0.009 6 <sup>2)</sup>	0.216 8 ± 0.007 4 <sup>2)</sup>

**3.2.4 肾组织 ILK 蛋白表达** 模型组大鼠在第 1, 2, 3 周肾小管上皮细胞的胞浆中 ILK 蛋白表达较正常组、假手术组明显增多 ( $P < 0.01$ ), 正常组肾间质

中均有较弱的表达, 益气活血降浊复方高、中、低剂量组较模型组比较显著降低 ( $P < 0.01$ ), 西药组较模型组表达也显著减少 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 5 益气活血降浊复方对 UUO 各组 ILK 蛋白吸光度的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ILK		
		第 1 周	第 2 周	第 3 周
正常	-	0.015 2 ± 0.004 3 <sup>2)</sup>	0.017 9 ± 0.004 9 <sup>2)</sup>	0.012 7 ± 0.001 9 <sup>2)</sup>
假手术	-	0.021 8 ± 0.004 2 <sup>2)</sup>	0.014 2 ± 0.003 5 <sup>2)</sup>	0.015 1 ± 0.007 3 <sup>2)</sup>
模型	-	0.202 3 ± 0.003 4	0.288 1 ± 0.053 1	0.262 6 ± 0.014 5
福辛普利钠	1 × 10 <sup>-2</sup>	0.050 1 ± 0.002 3 <sup>2)</sup>	0.056 7 ± 0.009 5 <sup>2)</sup>	0.054 5 ± 0.005 2 <sup>2)</sup>
益气活血降浊方	8.6	0.124 2 ± 0.007 6 <sup>2)</sup>	0.103 4 ± 0.003 2 <sup>2)</sup>	0.091 3 ± 0.004 9 <sup>2)</sup>
	17.3	0.072 9 ± 0.006 9 <sup>2)</sup>	0.071 5 ± 0.008 3 <sup>2)</sup>	0.062 2 ± 0.007 7 <sup>2)</sup>
	34.6	0.064 0 ± 0.004 6 <sup>2)</sup>	0.052 2 ± 0.004 6 <sup>2)</sup>	0.056 3 ± 0.009 7 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

TGF-β<sub>1</sub> 在肾间质纤维化的发生发展中起着重

要作用<sup>[3-5]</sup>: TGF-β 的信号转导受多环节、多层次的调控, 除 TGF-β 及其受体外, smad 信号激活及其抑

制性 smad 6, smad 7 表达下调,均参与了对 TGF- $\beta_1$  信号的调节。另外, TGF- $\beta_1$  可以同时活化 smad 2/3 和非 smad 信号传导途径,如整合素连接激酶( ILK ) 等,诱导 EMT 的发生。smad<sup>[6]</sup> 信号激活及其抑制性 smad 6, smad 7 表达下调,均参与了对 TGF- $\beta_1$  信号的调节。另外 smad7 能够与 smad2/3 相互竞争以抑制 TGF- $\beta_1$  的作用, TGF- $\beta_1$  通过 smad2/3 诱导 smad7 的产生,然而 smad6 主要为 BMP 所诱导,所以 smad7 对 TGF- $\beta_1$  主要起负调节作用。有研究表明 ILK 在肾小管上皮细胞的表达由 TGF- $\beta_1$  介导,且表现出时间、剂量相关性,因此有人提出 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK-EMT 轴的存在<sup>[7]</sup>。ILK 是一种细胞内的丝氨酸/苏氨酸( Ser/Thr ) 蛋白激酶,可与整合素  $\beta$  的胞质区相互作用,在不同类型的细胞中介导整合素信号传导。smad 与其下游效应器 ILK 在 TGF- $\beta_1$  介导的肾小管 EMT 过程中起关键性作用,主要参与 EMT 的以下 4 个关键步骤<sup>[8-10]</sup>:① 活化的 ILK 能直接磷酸化蛋白激酶( AKT ) 和糖原合成激酶-3( GSK-3 ),被 ILK 激活的 AKT 可抑制细胞的凋亡并促进上皮细胞间黏附的丢失。GSK-3 磷酸化后活性受抑,进而促进  $\beta$ -连环蛋白(  $\beta$ -catenin ) 的核转移、刺激 AP-1 和 CREB 蛋白转录因子的活性。激活的 CREB 也可促进肾小管上皮细胞间黏附的丢失。②  $\beta$ -catenin 的活化与核聚集在肾小管 EMT 过程中是必不可少的,其可能促进  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(  $\alpha$ -SMA ) 的表达。③ 被 ILK 激活的 AP-1 可刺激基质金属蛋白酶-9 的表达进而增加细胞的侵袭力,促进肾小管基底膜的破坏。④ ILK 通过钙依赖方式直接磷酸化 MLC 而促进细胞的收缩、迁移和浸润增加。因此,ILK 参与了 TGF- $\beta_1$ /smad 信号通路和激活下游因子的活动,进而在 TGF- $\beta_1$  介导肾小管 EMT 过程中扮演重要角色,在肾间质纤维化的发生发展中起关键作用。

本实验从中医益气活血降浊的组方机制出发,探讨益气活血降浊复方对 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号转导通路的影响,研究证实:益气活血降浊复方对 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号转导通路有抑制作用,益气活血降浊复方组较正常组、假手术组在各个时间点 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, 以及 ILK 蛋白表达有所增加,但与模型组比较显著降低(  $P < 0.01$  ),高剂量组在各个时间点降低 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, ILK 蛋白表达的效果最好。本实验中高剂量组在各个时间点增加 smad7 蛋白表达的效果最好且与西药组相当,中、低

剂量组虽然能增加 smad7 蛋白表达,但与高剂量组和西药组存在差异。说明益气活血降浊复方通过抑制 TGF- $\beta_1$ , p-smad2/3, ILK 表达,上调 smad7 的表达,从而影响 TGF- $\beta_1$ -smad-ILK 信号传导通路,抑制了肾间质纤维化发展。总之,益气活血降浊复方可能是通过调节 TGF- $\beta$ /smad 信号传导通路,并抑制其下游效应器 ILK 蛋白表达,使 EMT 合成增加而降解减少,进而发挥了抑制肾间质纤维化的作用。

## [参考文献]

- [ 1 ] 黎磊石,刘志红. 中国肾脏病学[ M ]. 北京:人民军医出版社,2008:1071.
- [ 2 ] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[ J ]. J Am Soc Nephrol,2004,15 ( 1 ):1.
- [ 3 ] 李相辉,赵宗江. 基质金属蛋白酶-9 及组织抑制剂-1 与肾间质纤维化[ J ]. 中国中西医结合肾病杂志,2007,8(3):179.
- [ 4 ] 赵宗江. 组织细胞分子学实验原理与方法[ M ]. 北京:中国中医药出版社,2003:209.
- [ 5 ] Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts smad signal transduction[ J ]. Am J Pathol, 2003,163:621.
- [ 6 ] Dai C, Yang J, Liu Y. Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of smad signaling[ J ]. J Biol Chem,2003,278:12537.
- [ 7 ] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[ J ]. Am J Pathol, 2001, 159 ( 4 ):1465.
- [ 8 ] 王海燕. 肾脏病学[ M ]. 北京:人民卫生出版社,2009:799.
- [ 9 ] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Inhibition of integrin-linked kinase ( ILK ) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(7):3207.
- [ 10 ] Li Y, Yang J, Dai C, et al. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis[ J ]. J Clin Invest, 2003,112(4):503.

[责任编辑 聂淑琴]