

肾衰保肾胶囊改善腺嘌呤诱导大鼠肾间质纤维化的机制初探

徐鹏¹, 迟继铭², 王今朝², 李淑菊², 于梅², 刘娜², 张佩青^{2*}

(1. 广州中医药大学第二附属医院 肾内科, 广州 510120; 2. 黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150036)

[摘要] 目的: 研究拟从肾衰保肾胶囊对慢性肾间质纤维化大鼠细胞外基质积聚的影响的角度探讨肾衰保肾胶囊保护肾功能的机制。方法: Wistar 大鼠 60 只随机分为空白对照组、模型对照组、肾衰保肾胶囊低剂量组(0.324 g·kg⁻¹·d⁻¹)和肾衰保肾胶囊高剂量组(1.296 g·kg⁻¹·d⁻¹), 采用腺嘌呤 ig 复制慢性肾间质纤维化大鼠模型, 各组分别给药 8 周, 检测大鼠肾功能、病理变化, 采用免疫组化法检测肾组织中的 I 型胶原(Col I)、基质金属蛋白酶 1(MMP-1)、金属蛋白酶组织抑制物 1(TIMP-1)及纤溶酶原激活物抑制物 1(PAI-1)的表达。结果: 肾衰保肾胶囊能够改善模型大鼠肾脏纤维化程度, 降低血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿酸(UA)水平, 降低肾组织中的 Col I, TIMP-1 及 PAI-1 蛋白表达, 升高 MMP-1 蛋白表达, 与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: 肾衰保肾胶囊可能是通过增加 MMP-1 表达及减少 TIMP-1, PAI-1 的表达来减少模型大鼠肾组织中 I 型胶原的积聚, 进而发挥减轻肾间质纤维化保护肾功能的作用。

[关键词] 肾间质纤维化; 基质金属蛋白酶 1; 金属蛋白酶组织抑制物 1; 纤溶酶原激活物抑制物 1; 肾衰保肾胶囊

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0179-04

Protecting Mechanism of Shenshuai Baoshen Capsule on Renal Interstitial Fibroblast Induced by Adenine in Rats

XU Peng¹, CHI Ji-ming², WANG Jin-zhao², LI Shu-ju², YU Mei², LIU Na², ZHANG Pei-qing^{2*}

(1. Department of Nephrology, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;

2 Institute of Traditional Chinese Medicine in Heilongjiang Province, Harbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the Shenshuai Baoshen Capsule on extracellular matrix accumulation in rat renal interstitial fibroblast, and analyze the mechanisms of the kidney protection effects of the Shenshuai Baoshen Capsule. **Method:** Sixty Wistar rats were randomly divided into blank control group, model control group, Shenshuai Baoshen capsule low dose group and high dose group. The model was established by ig administration of adenine. Different groups were treated for 8 weeks, The pathological changes in kidney functions after therapy were observed. The protein collagen I, MMP-1 (matrix metalloproteinase-1), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) expression in kidney tissue were detected respectively by immunohistochemistry. **Result:** The pathological changes were reduced in Shenshuai Baoshen capsule group, Cr, BUN and UA were reduced, the expression of collagen I, TIMP-1, PAI-1 protein in kidney tissue were reduced, and the expression of MMP-1 was induced which had the significant difference compared with that in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The Shenshuai Baoshen Capsule could depress the collagen I protein accumulation in renal tissue, by rising MMP-1 expression, depressing TIMP-1, PAI-1 protein

[收稿日期] 20101013(007)

[第一作者] 徐鹏, 中医学博士后, 中医药防治慢性肾脏疾病, Tel: 13570383157, E-mail: dr_xupeng@163.com

[通讯作者] * 张佩青, 主任医师, 中医药防治慢性肾脏疾病, Tel: 0451-55653080, E-mail: zhangpeiqing@163.com

expression. Therefore, the renal interstitial fibroblast was relieving by Shenshuai Baoshen Capsule, and chronic renal failure progress was delayed.

[**Key words**] renal interstitial fibroblast; matrix metalloproteinase-1; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; plasminogen activator inhibitor; Shenshuai Baoshen Capsule

肾间质纤维化的主要特征是细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 的合成与降解失衡,使 ECM 在肾间质过度沉积,导致正常结构破坏,肾功能丧失^[1]。I 型胶原是肾间质 ECM 的主要成分,对 I 型胶原 (collagen I, Col I) 降解的调节在 ECM 积聚的过程中起着重要作用。降解 I 型胶原的酶系主要有两个,即基质金属蛋白酶系 (matrix metalloproteinases / tissue inhibitor of metalloproteinases, MMPs/TIMPs) 和丝氨酸蛋白酶系 (plasminogen activators/plasminogen activator inhibitors, PAs/PAIs)。肾衰保肾胶囊是根据慢性肾衰竭早、中期脾肾两虚,湿浊内蕴,血络瘀阻的病机研制的具有补脾肾、泻湿浊、解毒活血作用的有效药物。前期大量的临床研究及基础研究发现肾衰保肾胶囊能够显著降低慢性肾衰患者及模型动物的血肌酐及尿素氮^[2]水平,有效延缓慢性肾衰竭的进展,进一步研究发现该药物可能是通过抑制 TGF- β 1 及其受体 mRNA 的表达减轻肾间质纤维化^[3]。本研究通过腺嘌呤诱导大鼠慢性肾间质纤维化模型,观察肾衰保肾胶囊对模型大鼠肾功能、肾脏病理的影响以及对肾间质 I 型胶原、MMP-1、TIMP-1 及 PAI-1 蛋白表达的影响,旨在从肾间质 I 型胶原降解的角度探讨肾衰保肾胶囊保护肾功能减轻肾间质纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 (200 \pm 20) g,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供,合格证号黑动字第 P00102005。

1.2 药物与试剂 肾衰保肾胶囊由人参、熟地黄、大黄、桃仁、半夏等药物组成,每粒胶囊重 0.3 g,由黑龙江省中医研究院制剂中心提供,批号 061101。腺嘌呤,美国 Amresco 公司生产,批号 0526B32。血肌酐 (批号 20061118)、尿素氮 (批号 20060105)、尿酸 (批号 20060725) 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所第一分所提供,兔抗大鼠 I 型胶原多克隆抗体、兔抗大鼠 MMP-1 多克隆抗体、兔抗大鼠 TIMP-1 多克隆抗体、兔抗大鼠 PAI-1 多克隆抗体由武汉博士德生物工程公司提供。PV 二步法免疫组

化检测试剂由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.3 仪器 7020 全血生化自动分析仪 (日本日立公司)、RM2125 型石蜡切片机、UCT 型超薄切片机、轮转式组织切片机 (德国 LEICA 公司)、DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一横科技有限公司)、HHSy21-Ni 型电热恒温水箱 (北京长风仪器仪表厂)、Olympus Bx60 摄影显微镜 (日本 OLYMPUS)、Motic Med 6.0 真彩色病理图像分析系统 (麦克奥迪图像技术有限公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 60 只大鼠随机选取 10 只作为空白对照组,其余根据文献 [4-6] 进行模型复制。按 200 mg \cdot kg⁻¹ 剂量给予 2.0% 的腺嘌呤混悬溶液,前 12 日每日给药 1 次,第 12 日以后隔日给药 1 次,模型复制过程 24 d。模型复制结束后随机分为模型对照组、肾衰保肾胶囊低剂量组及肾衰保肾胶囊高剂量组。肾衰保肾胶囊低剂量组为临床等效组,按 0.324 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,肾衰保肾胶囊高剂量组为低剂量组的 4 倍量,按 1.296 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,空白组及模型组给予等剂量蒸馏水 ig,共给药 8 周。

2.2 标本采集 实验结束前 1 d 禁食、水 12 h,1% 戊巴比妥钠溶液 ip 麻醉后,腹主动脉采血 5 mL 离心 (3 000 \times g, 10 min),将血清置于 EP 管中保存,进行血肌酐、尿素氮及尿酸检测。纵向剖开右肾,迅速取 1/2 肾组织投入 4% 多聚甲醛溶液中固定,以备进行 HE 染色常规病理检测及免疫组织化学检测。

2.3 检测 血肌酐、尿素氮及尿酸检测采用 7020 全血生化自动分析仪检测。大鼠肾组织 Col-I, MMP-1, TIMP, PAI-1 蛋白表达的检测采用采用 PV 二步法免疫组织化学方法,按试剂盒说明进行操作。结果采用 Motic Med 6.0 真彩色病理图像分析系统进行分析,在 200 倍视野下,每组随机选取 5 张片子,每张片子随机选取 5 个不重复的肾间质视野,将图像输入计算机,计算面密度值的平均值进行统计分析。

2.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS 13.0 for widows 进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,两两比较应用 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肾衰保肾胶囊对模型大鼠 Scr, BUN, UA 变化的影响 结果见表 1。与空白组相比模型组大鼠 Scr, BUN, UA 水平显著升高 ($P < 0.01$),肾衰保肾胶囊能够显著降低,模型大鼠 Scr, BUN, UA 水平 ($P < 0.01$),不同剂量肾衰保肾胶囊在降低 Scr, BUN 水平上无显著性差异,肾衰保肾胶囊高剂量组较低剂量组更能显著降低 UA 水平 ($P < 0.05$)。

表 1 肾衰保肾胶囊对模型大鼠 Scr, BUN, UA 变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	Scr /μmol·L ⁻¹	UA /μmol·L ⁻¹
空白	-	3.36 ± 0.16 ⁽¹⁾	6.48 ± 1.66 ⁽¹⁾	18.67 ± 1.67 ⁽¹⁾
模型	-	7.82 ± 0.68	59.17 ± 4.58	38.57 ± 2.46
肾衰保肾胶囊	0.324	4.39 ± 1.07 ⁽¹⁾	38.69 ± 8.67 ⁽¹⁾	29.09 ± 2.51 ⁽¹⁾
	1.296	3.98 ± 0.80 ⁽¹⁾	29.57 ± 3.83 ⁽¹⁾	26.50 ± 2.19 ^(1,2)

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与肾衰保肾胶囊 0.324 g·kg⁻¹组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 肾衰保肾胶囊对模型大鼠肾脏病理的影响

空白组肾小管排列整齐,皮髓质分界清楚,肾间质无异常改变,无纤维组织增生,肾小管内无结晶物沉积(图 1A)。模型组:肾小管萎缩,上皮细胞变性、坏死,可见较多异物肉芽肿形成;间质纤维增生呈束状、多灶状或网状成片,肾小管内可见结晶沉积,未被结晶沉积的小管呈代偿性扩张(图 1B)。低剂量组:肾小管上皮细胞颗粒变性不明显,部分小管上皮细胞脱落,腔内有少量分泌物,小管代偿性扩张,严重者肾小管坏死,被增生的纤维结缔组织所替代,肾

小管间质内可见结晶沉积(图 1C)。高剂量组:结构基本正常,肾小管、肾间质结晶沉积偶见,部分小管内见少量分泌物,少数小管上皮细胞脱落,间质血管扩张、充血,纤维组织增生成小灶性少量分布(图 1D)。

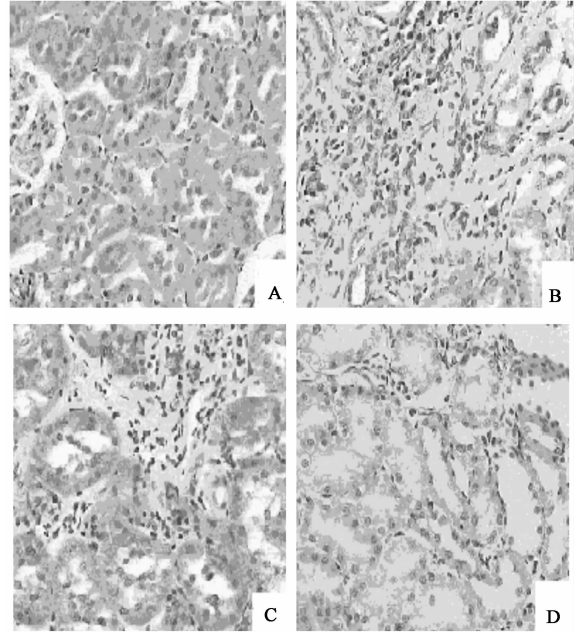


图 1 肾衰保肾胶囊对模型大鼠肾脏病理的影响(HE, ×200)

A. 空白组; B. 模型组; C. 肾衰保肾胶囊 0.324 g·kg⁻¹组;
D. 肾衰保肾胶囊 1.296 g·kg⁻¹组

3.3 肾衰保肾胶囊对模型大鼠肾组织 Col I, MMP-1, TIMP-1 及 PAI-1 的影响 结果见表 2。与空白组相比模型组大鼠肾组织中 Col I, MMP-1, TIMP-1, PAI-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$),肾衰保肾胶囊能够显著降低模型大鼠 Col I, TIMP-1, PAI-1 蛋白表达 ($P < 0.01$),升高 MMP-1 蛋白表达 ($P < 0.01$),肾衰保肾胶囊高剂量组的上述作用更为显著 ($P < 0.01$)。

表 2 肾衰保肾胶囊对模型大鼠肾组织 Col I, MMP-1, TIMP-1 及 PAI-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Col-I	MMP-1	TIMP-1	PAI-1
空白	-	13.83 ± 3.77 ⁽¹⁾	10.76 ± 4.29 ⁽¹⁾	11.75 ± 2.54 ⁽¹⁾	16.16 ± 3.16 ⁽¹⁾
模型	-	127.41 ± 23.62	26.84 ± 5.57	58.83 ± 8.93	145.28 ± 23.29
肾衰保肾胶囊	0.324	58.21 ± 5.85 ⁽¹⁾	41.63 ± 5.07 ⁽¹⁾	43.67 ± 11.61 ⁽¹⁾	69.94 ± 16.86 ⁽¹⁾
	1.296	50.79 ± 8.84 ^(1,2)	101.57 ± 21.35 ^(1,2)	26.41 ± 4.51 ^(1,2)	45.69 ± 14.30 ^(1,2)

4 讨论

肾间质纤维化是所有慢性肾脏疾病发展到慢性肾衰竭的共同的病理转归,如果能够减轻肾间质纤

维化的程度和(或)进展速度就可以延缓慢性肾衰竭的进展。I型胶原是肾间质的主要胶原成分,其过度积聚是导致肾间质纤维化的重要因素。导致 I

型胶原过度积聚的主要因素是其生成过多和(或)降解减少。影响 I 型胶原降解的主要酶系为基质金属蛋白酶系(MMPs/TIMPs)和丝氨酸蛋白酶系(PAs/PAIs),在 MMPs/TIMPs 系统中 MMP-1 对 I 型胶原的降解起主要作用,而 TIMP-1 是 MMP-1 的主要抑制物,TIMPs 除了能抑制已激活的 MMPs 的活性外,还能阻止或延缓酶原型 MMPs 转变为激活型 MMPs 的过程^[7],大量研究表明二者表达的失衡是造成肾间质 ECM 积聚的重要因素。PAs/PAIs 系统为肾间质 ECM 降解的另一大酶系,该系统除可以直接降解 ECM 外,更重要的是其可以激活 MMPs,形成 PAs/纤溶酶/MMPs 的瀑布激活放大效应,发挥病理生理效应。在 PAs/PAIs 系统中 PAI-1 是该系统主要的抑制物,PAI-1 可以抑制纤溶酶原激活物的活化,进一步抑制 MMP-1 的活化,从而抑制 MMP-1 对 I 型胶原的降解作用。MMP-1, TIMP-1 及 PAI-1 三者构成了调节 I 型胶原降解的系统,其中 MMP-1 是降解 I 型胶原的主要的酶,而 TIMP-1 及 PAI-1 从不同层次上调节 MMP-1 的活性,进而间接调节 I 型胶原的降解的作用。本研究病理结果显示模型组大鼠肾间质纤维化程度明显重于空白组,免疫组化结果进一步显示模型组 I 型胶原表达量明显高于空白对照组,该结果提示 I 型胶原的过多表达是导致肾间质纤维化的重要因素。模型组 MMP-1, TIMP-1 及 PAI-1 蛋白表达较空白组升高,说明 MMP-1, TIMP-1 及 PAI-1 三者功能失调可能是导致 I 型胶原积聚的重要因素。

慢性肾衰竭属于中医“虚劳”、“关格”范畴,张佩青教授认为本病的病机是本虚标实之症,本虚以脾肾亏虚为主,标实以湿浊(热)、瘀血、毒邪为主。课题组根据多年临床经验总结出具有补脾肾、化湿浊、解毒活血作用的肾衰保肾胶囊,通过临床观察发现该药物能够改善患者临床症状和体征,降低慢性肾衰竭患者的肌酐、尿素氮水平,提高肾小球滤过率,调节脂质代谢紊乱及钙磷代谢紊乱,降低血清 III 型前胶原等纤维化指标^[8,9],本研究动物实验结果同样显示该药物能够降低模型动物的 Scr, BUN, UA 水平保护模型动物的肾脏功能,该药物主要包括以人参为代表的健脾药物、以熟地黄为代表的补肾药、以桃仁为代表的活血药、以及以大黄、半夏为代表的化湿解毒药物,在组方上紧扣慢性肾衰竭的病机,从

4 个方面发挥作用,具有扶正祛邪,消补兼施,扶正不留邪,祛邪不伤正,平补平泄,相得益彰的特点。

本研究从肾衰保肾胶囊对慢性肾间质纤维化大鼠细胞外基质积聚的影响的角度探讨肾衰保肾胶囊保护肾功能的机制,结果显示肾衰保肾胶囊能够改善模型动物的肾脏功能,减少 I 型胶原表达,减轻肾间质纤维化的程度,进一步研究发现该药物能够上调 MMP-1 蛋白表达,下调 TIMP-1 及 PAI-1 蛋白表达。说明肾衰保肾胶囊可能是通过增加 MMP-1 的表达,促进 MMP-1 对 I 型胶原的降解,同时通过减少 TIMP-1 及 PAI-1 的表达,减轻对 MMP-1 的抑制作用间接促进了对 I 型胶原的降解作用,从而发挥减轻肾间质纤维化保护肾脏功能的作用。

[参考文献]

- [1] 董凤芹,蔡伟民,李红. 肾纤维化发病机制的研究进展[J]. 国外医学·泌尿系统分册,2003,23(4):457.
- [2] 张佩青,刘锂,乔会秀. 肾衰保肾胶囊延缓腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭的实验研究[J]. 中医药学报,2007,35(1):22.
- [3] 刘锂,张佩青,徐鹏,等. 肾衰保肾胶囊对肾间质纤维化大鼠 TGF- β 1 及其受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2007,8(11):651.
- [4] 王桐生,龙子江,黄金玲,等. 肾力欣颗粒对腺嘌呤致慢性肾功能衰竭模型大鼠的防治作用[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(6):399.
- [5] 晏子友,黎元元,王琼,等. 肾衰泻浊汤对腺嘌呤大鼠肾小管间质损伤的影响[J]. 中国中医药科技,2002,9(6):327.
- [6] 傅晓晴,武一曼,陈振彬,等. 腺嘌呤制作肾阳虚型慢性肾功能衰竭大鼠模型的电镜病理学研究[J]. 福建中医学院学报,2002,7(6):41.
- [7] Rapti M, Knauper V, Murphy G, et al. Characterization of the AB loop region of TIMP-2. Involvement in pro-MMP-2 activation [J]. J Biol Chem. 2006, 281(33): 23386.
- [8] 李淑菊,张佩青,黄彦彬. 肾衰胶囊延缓失代偿期慢性肾功能衰竭进展——39 例临床观察[J]. 中医杂志,2005,46(5):348.
- [9] 王少华,张佩青. 肾衰胶囊治疗慢性肾功能衰竭 90 例临床观察[J]. 中医杂志,2003, 44(9):669.

[责任编辑 聂淑琴]