

抗纤灵方对5/6肾切除大鼠肾纤维化及ACE-Ang II-AT1R轴的影响

吉晶^{1,2}, 何立群^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 200123; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:探讨抗纤灵方对SD大鼠肾纤维化及肾素血管紧张素转换酶-血管紧张素II-血管紧张素II 1型受体(ACE-Ang II-AT1R)轴的影响。方法:将50只SD大鼠随机分成正常组($n=10$),假手术组($n=10$),5/6肾切除肾纤维化手术组($n=30$)。术后2周,将手术组大鼠随机分成模型组、抗纤灵组、氯沙坦钾组,各组10只。抗纤灵组给予抗纤灵方($21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),氯沙坦钾组给予氯沙坦钾($33.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),其他组给予等体积的生理盐水,每天1次,持续16周。测定生化指标血肌酐、尿素氮及24h尿蛋白;苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织病理改变;马松(Masson)染色观察肾纤维化程度;免疫组化检测ACE1,AT1R表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定ACE1,Ang II,AT1R蛋白表达水平。结果:与正常组和假手术组比较,模型组的血肌酐、尿素氮及24h尿蛋白均显著增加($P<0.01$);与模型组比较,抗纤灵组及氯沙坦钾组血肌酐、尿素氮及24h尿蛋白水平均明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。HE及Masson染色显示,与模型组相比较,抗纤灵组及氯沙坦钾组肾脏纤维化程度都减轻。Western blot显示抗纤灵组及氯沙坦钾组ACE1,Ang II,AT1R明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);免疫组化结果显示,ACE1,AT1R水平显示出与Western blot一样的变化。结论:抗纤灵方可延缓5/6肾切除大鼠肾纤维化的进展,该机制与抑制ACE-Ang II-AT1R轴的激活密切相关。

[关键词] 5/6肾切除;肾纤维化;抗纤灵方;肾素血管紧张素转换酶-血管紧张素II-血管紧张素II 1型受体(ACE-Ang II-AT1R)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)01-0057-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190122

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181016.1530.012.html>

[网络出版时间] 2018-10-19 13:48

Effect of Kangxianling Decoction on Renal Fibrosis and ACE-Ang II-AT1R Axis in 5/6 Nephrectomized Rats

JI Jing^{1,2}, HE Li-qun^{1,2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200123, China;

2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the therapeutic effect of Kangxianling decoction on renal fibrosis induced by 5/6 nephrectomy, and angiotensin converting enzyme-angiotensin II-angiotensin II 1 receptor (ACE-Ang II-AT1R) axis. **Method:** Totally 50 SD rats were randomly divided into the following groups: control group ($n=10$), sham-operation group ($n=10$), 5/6 nephrectomized renal fibrosis model group ($n=30$). After two weeks, the rats in operation group were divided into the model group, Kangxianling group, and losartan potassium group, $n=10$ in each group. Rats in losartan potassium group were administered with losartan potassium by gastrogavage, and rats in Kangxianling group were administered with Kangxianling by gastrogavage. Equal volume of saline was

[收稿日期] 20180724(020)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81403358);上海市名老中医学术经验研究工作室项目(SHGZS-2017027);上海中医药大学研究生“创新能力培养”专项科研项目(Y201804)

[第一作者] 吉晶,在读博士,从事中医药防治慢性肾脏疾病的研究,E-mail:jj664758895@qq.com

[通信作者] *何立群,主任医师,博士生导师,教授,从事中医药防治慢性肾脏疾病的研究,Tel: 021-53821650, E-mail: heliqun59@163.com

administered to rats in the other groups. The rats were put to death after 16 weeks of consecutive medication, and serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), 24 h urine protein (24 h-Pro) were measured in each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of kidney tissues, and the degree of renal fibrosis was observed by Masson staining. The expressions of ACE1 and AT1R were detected by immunohistochemistry. The protein expression levels of ACE1, Ang II and AT1R were determined by Western blot. **Result:** Compared with control and sham-operation groups, SCr, BUN and 24 h-Pro in model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, SCr, BUN and 24 h-Pro levels in the Kangxianling group and the losartan potassium group were significantly lower, with statistically significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). HE and Masson staining showed that the degree of renal fibrosis was reduced in Kangxianling group and losartan potassium group compared with model group. Western blot showed that ACE1, Ang II and AT1R in Kangxianling group, and the losartan potassium were significantly lower than the model group, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Immunohistochemistry results showed that the levels of ACE1 and AT1R showed the same changes as Western blot. **Conclusion:** Kangxianling decoction can delay the progress of renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats, which is closely related to the inhibition of ACE-Ang II-AT1R axis activation.

[**Key words**] 5/6 nephrectomy; renal fibrosis; Kangxianling decoction; angiotensin converting enzyme-angiotensin II-angiotensin II 1 receptor (ACE-Ang II-AT1R)

肾纤维化是各种肾脏疾病的常见终点,可导致肾功能受损并最终发展为终末期肾衰竭^[1]。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)控制血压并调节肾脏中的水和盐代谢,参与肾脏疾病的发生和发展,局部 RAS 在肾脏中的作用正日益受到关注^[2]。RAS 的激活,增加了血管紧张素 II (Ang II)的水平^[3]。在 RAS 系统中,Ang II 的作用最为重要,Ang II 不仅存在于循环系统中,肾素原、肾素和血管紧张素原也存在于肝脏和肾脏中^[4]。经典 RAS 定义为肾素血管紧张素转换酶-Ang II-血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin-converting enzyme-Ang II-angiotensin II type 1 receptor, ACE-Ang II-AT1R)轴,其促进血管收缩、水摄入、钠潴留和其他维持血压的机制,以及在病理条件下增加氧化应激、纤维化、细胞生长和炎症,因此其可能是肾纤维化的潜在靶点^[5]。针对气滞血瘀的发病机制,何立群教授研发的抗纤灵方由丹参、制大黄、怀牛膝、当归、桃仁组成。方中丹参活血祛瘀,通络补肾气;桃仁祛瘀活血;牛膝益气、补肾、强筋骨,活血化瘀;大黄清热、泄浊、活血;当归补血活血,祛瘀止痛。纵观抗纤灵方,活血化瘀,温凉并用,攻补调和,扶正气,通脏腑,泄浊气,泄而不伤正,补而不泄邪。对 CKD 3-4 期患者有良好的临床疗效和较好的安全性,在减少蛋白尿和延缓肾功能衰竭方面效果显著^[6]。课题组前期研究发现抗纤灵方可降低肾纤维化小鼠肾组织 CD68, CD45, 血管内皮细胞黏附分子(VCAM-1)的

表达,减轻肾纤维化^[7];能够减少小鼠 24 h 尿蛋白(24 h-pro)定量和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K),蛋白激酶 B(Akt),雷帕霉素靶体蛋白(mTOR) mRNA 含量,改善肾功能,拮抗肾纤维化发生^[8];改善大鼠肾功能及组织细胞外基质(ECM)表达,抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路激活^[9-10];其含药血清可抑制大鼠成纤维细胞转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的表达,减少 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK), α -肌动蛋白(α -SMA),I 型胶原等细胞外基质(ECM)的沉积,从而延缓肾纤维化^[11]。本研究着眼于肾组织 RAS 系统,探索抗纤灵方延缓肾纤维化进展的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,由上海必凯动物有限公司提供,50 只,合格证号 SCXK(沪)2013-0016,所有动物实验部分均符合上海中医药大学动物伦理委员会要求,伦理委员会登记编号 SZY2017020041。于上海中医药大学实验动物中心适应性饲养,自由进食和饮水,每日人工光照 7:00-19:00,1 周后进行实验。

1.2 药物和试剂 抗纤灵方由丹参 15 g,大黄 15 g,怀牛膝 15 g,当归 12 g,桃仁 12 g 组成,购自上海中医药大学附属曙光医院。经上海中医药大学附属曙光医院陈刚主任中医师和沈沛成主任医师分别进行盲法鉴定,所有药材均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范。氯沙坦钾片(杭州默沙东药业有

限公司,批号 J20130048)。AT1R,ACE1 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab18801, ab216476); Ang II 抗体(上海生工生物工程有限公司,批号 D120217);戊巴比妥钠(上海医药集团股份有限公司);4%多聚甲醛,RIPA 裂解液,10×TBST 缓冲液,兔抗二抗,鼠抗二抗,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,中性树胶封片剂,蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂,PMSF,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,通用型强力抗原修复液,苏木素伊红染色试剂盒,ECL 超敏发光试剂盒,5% BSA 封闭液,防脱玻片,即用型 SABC 过氧化物试剂盒,DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒-棕黄色,超敏聚合酶免疫化学检测试剂盒,苏木素-伊红(HE),马松(Masson)染色试剂(上海威奥生物公司,批号分别为 WH1013, WB0101, WH1186, WB0177, WB0176, WB0197, WH1161, WB2118, WB0117, WB0114, WB0125, WB0130, WB1036, WH2144, WB0164, WB2051, WB1025, WB1057, WB0167, WB1083, D026, WH1144);预染蛋白 marker(美国 Thermo 公司,批号 26616)。

1.3 仪器 Synergy2 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),DW-25L262 型医用低温保存箱(青岛海尔公司),Thermo 905 系列超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),FluorChem M 型自动成像分析系统(美国 Protein Simple 公司),041BR155637 型 mini-protein tetra cell 垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),Hitachi7080 型全自动生化仪(日本 Tokyo 公司),Axio Lab A1 型正置显微镜(德国 Zeiss 公司),GR85DR 型高压灭菌锅(美国致微公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 5/6 肾切除法建立肾纤维化模型^[12],正常组不做任何处理,假手术组不切除肾脏,分两次拨开两侧肾包膜。2 周后,对大鼠进行内眦静脉取血,测量正常组、假手术组、手术组的大鼠血清肌酐值,血清肌酐值明显高于正常组和假手术组作为衡量造模成功的标准,接着根据血清肌酐值把造模成功的老鼠分为 3 组(包括模型组、抗纤灵方组、氯沙坦钾组,每组各 10 只),使实验组间血清肌酐无显著差异。

2.2 给药及标本收集 正常组、假手术组和模型组给予等体积的生理盐水,10 mL·kg⁻¹;抗纤灵组和氯沙坦钾组大鼠每天剂量分别为 21 g·kg⁻¹ 和 33.3 g·kg⁻¹,按照成人单位体重临床用药的 20 倍

换算,每日 1 次,喂养 16 周,实验结束前禁食禁水 8 h,持续灌胃 24 周后处死。处死前 1 d,代谢笼留取 24 h 尿液,同时腹主动脉取血后 4 ℃,3 000 r·min⁻¹离心 10 min。分离血清和左侧残余肾脏组织,冻存于 -80 ℃ 冰箱以备检测。

2.3 肾功能及 24 h-Pro 检测 全自动生化分析仪测定各组大鼠血肌酐(SCr),尿素氮(BUN)及 24 h-Pro 水平。

2.4 HE 及 Masson 胶原纤维染色检测肾脏组织病理学变化 肾脏组织经石蜡包埋切片(4 μm),经脱蜡、水化后,HE 和 Masson 染色,200 倍正置显微镜下观察肾脏病理变化。Masson 染色选取 5 个不重叠的肾皮质四周及中央视野区域,ImagePro Plus 6.0 计算胶原纤维百分比 = 胶原纤维面积/整个视野面积 × 100%,结果取胶原纤维面积百分比平均值。

2.5 免疫组化法检测 ACE1, AT1R 蛋白表达 肾脏组织病理切片经脱蜡、水化后,经新配置的 3% H₂O₂ 封闭 10 min,并用蒸馏水清洗,0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸钠缓冲液热修复,滴加山羊血清封闭液,室温 20 min,不洗,甩出多余液体。滴加抗 ACE1 抗体(1:200),抗 AT1R 抗体(1:200),4 ℃ 孵育过夜,二抗 37 ℃ 孵育 20 min,DAB 显色,自来水冲洗,苏木素复染 1~2 min,盐酸乙醇分化,自来水再次冲洗,脱水、透明、封片、镜检。每只大鼠肾脏组织留取 3 张切片,400 倍显微镜下每张切片选取 3 个视野,结果用 Image Pro Plus 6.0 软件计算取各组的积分吸光度 IA 平均值。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ACE1, Ang II, AT1R 蛋白表达 残肾组织 50 mg 加入 RIPA 强裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂、PMSF,置碎冰上超声匀浆破碎,并离心取上清液,蛋白定量后,95 ℃ 变性 10 min,离心后 -80 ℃ 保存。10% 的胶电泳,转移至 PVDF 膜,封闭 1 h,然后分别加入抗 ACE1 抗体(1:1 000),Ang II 抗体(1:800),AT1R 抗体(1:100),4 ℃ 摇床过夜。第 2 天 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗(1:5 000),室温于摇床孵育 1 h,再 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,显影曝光。Image J 测定目的条带与内参 GAPDH 的灰度值之比来反应蛋白表达水平。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 23.0 进行统计分析,结果计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式来表示。组间均数对比采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肾纤维化大鼠肾功能的影响 与正常组和假手术组比较,模型组 SCr, BUN, 24 h-Pro 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,抗纤灵组及氯沙坦钾组 SCr, BUN, 24 h-Pro 均明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

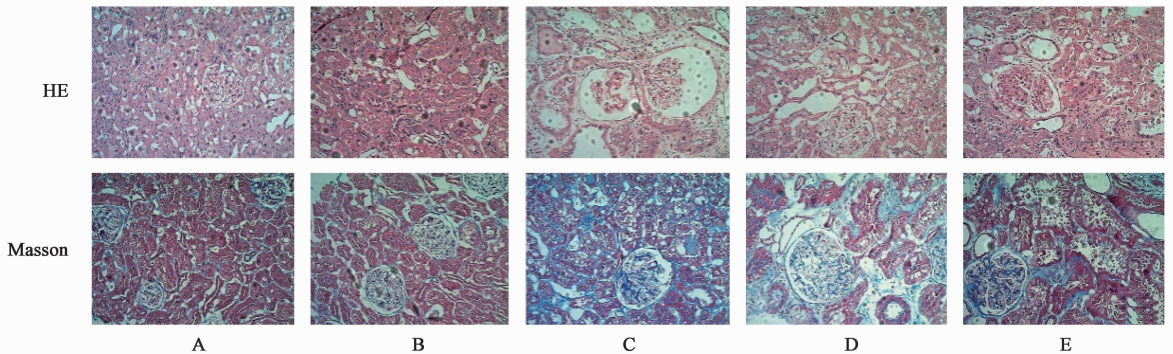
表 1 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of Kangxianling decoction on renal function in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	SCr /μmol·L ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	24 h-Pro /mg·L ⁻¹
正常	10	-	18.25 ± 3.24	4.40 ± 1.27	9.86 ± 0.76
假手术	10	-	19.38 ± 3.07	5.28 ± 0.90	11.04 ± 1.23
模型	7	-	70.25 ± 7.74 ²⁾	20.39 ± 4.95 ²⁾	23.76 ± 4.03 ²⁾
抗纤灵方	9	21	59.75 ± 9.63 ³⁾	15.2 ± 1.87 ⁴⁾	15.84 ± 1.45 ⁴⁾
氯沙坦钾	8	33.3	45.62 ± 6.41 ^{4,6)}	12.53 ± 3.14 ⁴⁾	13.16 ± 1.38 ⁴⁾

注:与正常组和假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与抗纤灵组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对肾纤维化大鼠肾脏组织病理学的影响 HE 染色显示,正常组和假手术组肾小球几乎无病变或轻微病变,无肾小管萎缩及肾小囊扩张表现,肾脏间质并无纤维化,无炎症细胞浸润。模型组可见肾小球局灶节段性中重度硬化,肾小囊扩张,球囊相互黏连,系膜细胞及基质中至重度增生,肾小管萎缩,小管上皮细胞空泡及颗粒状变性,肾间质单核、淋巴细胞浸润伴随纤维化。抗纤灵组及氯沙坦钾组可见肾小球轻度变形,系膜细胞及基质轻度增生,肾间质少量炎症细胞浸润,纤维化程度明显改善。见图 1。

3.3 对肾纤维化大鼠肾脏组织纤维化的影响 Masson 染色显示,正常组和假手术组血管壁间质正常,肾小球正常,无系膜细胞增生,肾脏组织少量胶原纤维表达;模型组大鼠肾小球体积增大,系膜细胞增多,基底膜增厚,间质炎症细胞浸润,小动脉管壁增厚,玻璃样变,肾脏组织胶原纤维表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组对比,抗纤灵组及氯沙坦钾组肾小管扩张或萎缩减轻,病变明显比模型组减轻,纤



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 抗纤灵方组;E. 氯沙坦钾组(图 2,3 同)

图 1 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾脏组织病理形态学的影响 ($\times 200$)

Fig. 1 Effect of Kangxianling decoction on kidney pathological morphology in renal fibrosis rats ($\times 200$)

维化组织和炎性细胞减少,胶原纤维面积均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2 和图 1。

表 2 抗纤灵方对肾纤维化大鼠阳性染色面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of Kangxianling decoction on positive staining area in renal fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	阳性染色面积/%
正常	10	-	1.40 ± 0.03
假手术	10	-	2.04 ± 0.06
模型	7	-	9.52 ± 0.31 ²⁾
抗纤灵方	9	21	5.37 ± 0.11 ⁴⁾
氯沙坦钾	8	33.3	7.36 ± 0.16 ^{4,6)}

3.4 对肾纤维化大鼠肾脏组织 ACE1, AT1R 蛋白表达的影响 在 400 倍正置显微镜下,ACE1 免疫组化结果显示,正常组和假手术组肾细胞周围只有少

量棕黄色颗粒沉着,模型组肾细胞及周围可见大量棕黄色深染,与正常组和假手术组比较,模型组 ACE1 IA 显著升高 ($P < 0.01$)。AT1R 免疫组化结果显示,正常组和假手术组肾组织染色弱阳性,少量 AT1R 蛋白存在于肾脏间质,而模型组细胞内棕色阳性细胞明显增多,与正常组和假手术组比较,模型组 AT1R IA 显著升高 ($P < 0.01$)。抗纤灵组和氯沙坦钾组 ACE1, AT1R 黄色颗粒 IA 表达较模型组显著减少 ($P < 0.01$)。见图 2 和表 3。

3.5 对肾纤维化大鼠肾脏组织 ACE, Ang II, AT1R 蛋白表达的影响 与正常组和假手术组比较,模型组 ACE, Ang II, AT1R 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比较,抗纤灵组和氯沙坦钾组 ACE, Ang II, AT1R 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。

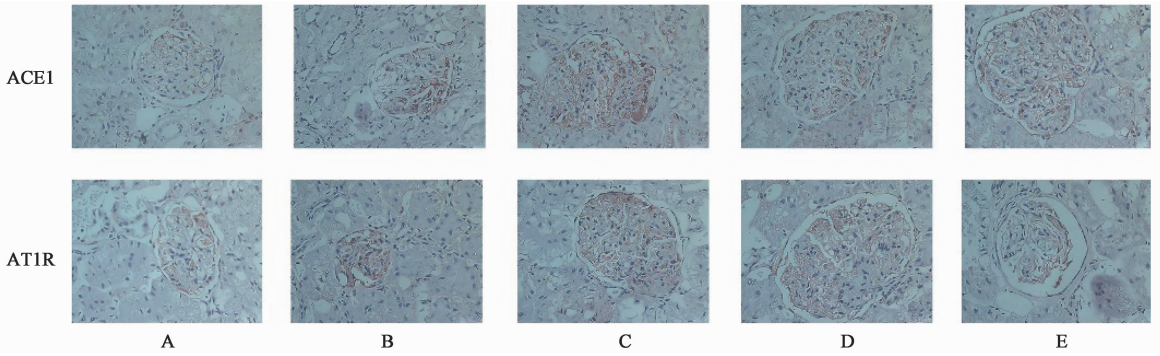


图 2 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾组织 ACE1, AT1R 阳性表达影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Kangxianling decoction on immunohistochemical expressions of ACE1 and AT1R in renal tissues of rats(IHC, ×400)

见图 3 和表 4。

表 3 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾组织 ACE1, AT1R IA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Kangxianling decoction on IA of ACE1 and AT1R in renal tissues of rats with renal fibrosis($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	ACE1 (×10 ³)	AT1R (×10 ³)
正常	10	-	3.32 ± 0.24	2.96 ± 0.11
假手术	10	-	3.63 ± 0.34	3.44 ± 0.38
模型	7	-	5.38 ± 0.82 ²⁾	4.97 ± 0.95 ²⁾
抗纤灵方	9	21	4.37 ± 0.55 ⁴⁾	4.27 ± 0.62 ⁴⁾
氯沙坦钾	8	33.3	4.15 ± 0.39 ^{4,5)}	3.90 ± 0.48 ^{4,5)}

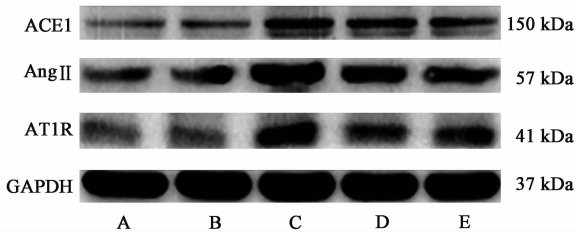


图 3 大鼠肾组织 ACE1, Ang II, AT1R 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of ACE1, Ang II and AT1R in renal tissues

表 4 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾脏组织 ACE1, Ang II, AT1R 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Kangxianling decoction on protein expressions of ACE1, Ang II and AT1R in renal tissues of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	ACE1 /GAPDH	Ang II /GAPDH	AT1R /GAPDH
正常	10	-	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.31 ± 0.01
假手术	10	-	0.37 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.32 ± 0.02
模型	7	-	0.59 ± 0.03 ²⁾	0.72 ± 0.03 ²⁾	0.67 ± 0.02 ²⁾
抗纤灵方	9	21	0.50 ± 0.03 ⁴⁾	0.55 ± 0.01 ⁴⁾	0.41 ± 0.01 ⁴⁾
氯沙坦钾	8	33.3	0.41 ± 0.01 ^{4,6)}	0.51 ± 0.02 ⁴⁾	0.45 ± 0.01 ⁴⁾

4 讨论

肾纤维化的发生与发展是一个动态的病理过

程,符合动态演变规律。肾脏固有细胞开始损伤出现炎症反应,表现为慢性肾炎的特征;损伤严重,细胞丧失功能,表型硬化成为肾纤维化;纤维化逐步发展,残存的肾单位低于 10%,进入代谢性酸中毒阶段,转变为终末期肾衰竭^[13]。在炎症的刺激下,肾脏成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞会大量增加,分泌不容易被降解的 I 型和 III 型胶原蛋白,导致细胞外基质合成速率加快,降解速度降低,形成肾小球硬化、肾纤维化^[14-16]。本研究通过 5/6 肾切除诱导肾纤维化模型,通过肾脏组织病理染色等病理学方法呈现出肾小球局灶节段性硬化,肾小囊扩张,球囊相互黏连,系膜细胞及基质中至重度增生,肾小管萎缩,肾间质大量炎症细胞浸润;免疫组化染色法可见模型组 ACE1, AT1R 棕黄色颗粒明显增多,Western blot 可见模型组 ACE, Ang II, AT1R 蛋白表达明显升高。因此如何有效抑制 ACE-Ang II -AT1R 轴的激活是治疗肾纤维化的关键问题。

RAS 系统的激活,Ang II 和 AT1R 相结合上调可以直接损害肾脏,是肾纤维化的重要发病机制之一^[17]。Ang II 包括 2 种受体,Ang II 的 I 型受体(AT1)和 II 型受体(AT2),生物学作用主要是由 AT1 介导的^[18-19]。RAS 系统是人体内重要的内分泌系统,遍及心、肝、肾等各种局部组织,共同参与靶器官的调节。Ang II 是 RAS 系统的主要活性物质,不仅作为血管活性物质促进肾小球高滤过,更是一种促生长因子,可以通过诱导全身和肾小球高血压,引起继发于肾内血管收缩的缺血性肾损伤,减少肾血流量,升高滤过膜通透性导致蛋白尿,增加管周毛细血管网的丢失,造成无效的细胞呼吸等血流动力学的作用,进一步促进肾小球硬化、肾间质纤维化^[20]。在纤维化过程中,Ang II 也作为一种促炎细胞因子,其激活单核细胞,增加的促炎介质(细胞因

子,趋化因子,黏附分子, NF- κ B) 可能引起局部炎症^[21-22]。在该实验中,5/6 肾切除术后,肾的局部及外周 RAS 系统被激活,并且 ACE-Ang II-AT1R 轴被激活,肾纤维化模型组 RAS 中 ACE, Ang II, AT1R 表达均升高。给予抗纤灵方干预后,与模型组相比,治疗组肾脏组织中 ACE, Ang II, AT1R 蛋白表达均下降,抑制了 RAS 系统的激活并延缓了肾纤维化的进展。西药采用氯沙坦钾,经典 RAS 干预药血管紧张素 II 受体阻滞剂(angiotensin II receptor blockage, ARB),可延缓肾纤维化模型动物的疾病进展^[23-26]。

以上研究均证实抗纤灵方可以直接作用于 RAS 系统,拮抗 ACE, Ang II, AT1R 的生成,降低血肌酐、尿素氮水平,减少 24 h 蛋白尿定量,延缓肾纤维化的进展。其机制考虑与负性调节 ACE-Ang II-AT1R 轴抑制肾纤维化有关。综上所述,本研究为抗纤灵方在临床应用于肾纤维化的治疗提供了理论依据。

[参考文献]

[1] WANG M, CHEN D Q, WANG M C, et al. Poricoic acid ZA, a novel RAS inhibitor, attenuates tubulo-interstitial fibrosis and podocyte injury by inhibiting TGF-beta/Smad signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2017, 36: 243-253.

[2] LI X Y, PENG Y, BU X W, et al. Balancing effect of Biejiajian Oral Liquidon ACE-Ang II-AT1R axis and ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis in rats with CCl 4-induced hepatic fibrosis [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, doi: 10.1007/s11655-017-2909-7.

[3] Graciano M L, Cavaglieri R C, Dellè H, et al. Intrarenal renin-angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(7): 1805-1815.

[4] Nguyen G. Renin/prorenin receptors [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(9): 1503-1506.

[5] Chappell M C. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function [J]. *Comp Physiol*, 2012, 2(4): 2733-2752.

[6] 张长明, 周家俊, 何立群, 等. 抗纤灵方治疗慢性肾脏病 3 期患者 110 例临床研究 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(3): 214-217.

[7] 陈建, 应汝炯, 盛昭园, 等. 抗纤灵方对肾纤维化小鼠肾组织 CD68、CD45、VCAM-1 表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(9): 781-785.

[8] 钟利平, 麻志恒, 余柯娜, 等. 抗纤灵方通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路干预肾纤维化机制研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(18): 126-129.

[9] 吉晶, 何立群. 抗纤灵方对肾纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smad 信号通路表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 69-75.

[10] 吉晶, 何立群. 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾功能及肾组织 ECM 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 63-68.

[11] 孟令娜, 施艳, 顾耀东, 等. 抗纤灵方对体外培养肾成纤维化细胞 TGF- β_1 /p38MAPK 信号通路干预的实验研究 [J]. *四川中医*, 2015, 33(3): 43-45.

[12] Ma S K, Joo S Y, Kim C S, et al. Increased Phosphorylation of PI3K/Akt/mTOR in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. *Chonnam Med J*, 2013, 11(3): 108-112.

[13] 吉晶, 何立群. 中西医防治肾纤维化的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 221-228.

[14] 李林蔚, 周景华, 刘华生. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 FN 及 α -SMA 的影响 [J]. *黑龙江医药*, 2014, 27(2): 265-267.

[15] 苏兆亮, 王映梅, 刘嫣方, 等. IL-17 对小鼠心肌成纤维细胞 I/III 胶原表达的作用研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(9): 897-900.

[16] 钟利平, 麻志恒, 余柯娜, 等. 抗纤灵方对 5/6 肾切除小鼠肾组织纤维化作用机制研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(2): 118-121.

[17] 罗来敏, 周红霞. 前列环素衍生物对慢性肾衰大鼠肾脏局部 RAS 系统关键因子表达的影响 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2018, 38(3): 310-316.

[18] Friedrich C. Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin; targets for progression of cardiovascular and renal diseases [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002, 11(1): 59-66.

[19] CHENG C L, TANG Y, ZHENG Z, et al. Advanced glycation end-products activate the renin-angiotensin system through the RAGE/PI3K signaling pathway in podocytes [J]. *Clin Invest Med*, 2012, 35(5): E282.

[20] 祝婷婷, 范德生, 杨婧, 等. Ang II 拮抗剂对慢性肾衰大鼠肾血流量和肾内氧耗的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 1-6.

[21] Rodrígueziturbe B, Johnson R J, Herreraacosta J. Tubulointerstitial damage and progression of renal failure [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(99): S82-S86.

[22] 杨乐, 邹晓静, 尹钊, 等. 丹参酮 II_A 磺酸钠对 Ang II 诱导心房成纤维细胞胶原合成及 TGF- β_1 活化的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6): 1093-1096.

[23] Breyer M D, Susztak K. The next generation of therapeutics for chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(8): 568-588.

[24] Patel S N, Ali Q, Hussain T. Angiotensin II type 2-receptor agonist C21 reduces proteinuria and oxidative stress in kidney of high-salt fed obese Zucker rats [J]. *Hypertension*, 2016, 67(5): 906-915.

[25] Makhloogh A, Kashi Z, Akha O, et al. Effect of spironolactone on diabetic nephropathy compared to the combination of spironolactone and losartan [J]. *Nephrourol Mont*, 2014, 6(1): e12148.

[26] 霍苗苗, 程变巧, 林伟国, 等. 扶正化癆方对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝纤维化及 ACE-Ang II-AT1R 轴的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(2): 114-119.

[责任编辑 周冰冰]