

· 药理 ·

大黄蛭虫丸加减对大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制

李军娜¹, 马华^{2*}, 马天成², 田树杰²

(1. 山西医科大学, 太原 030000; 2. 山西医科大学第二医院, 太原 030000)

[摘要] **目的:**探讨大黄蛭虫丸加减对梗阻性肾病大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制。**方法:**采用单侧输尿管结扎(UUO)致大鼠肾间质纤维化模型,将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,分别为假手术组,模型组,依那普利组(0.001 g·kg⁻¹),大黄蛭虫丸加减大、小剂量组(19, 9.5 g·kg⁻¹)。术后第 15 天处死各组大鼠,收集血清,酶法测定血肌酐(SCr),尿素氮(BUN)水平,收集 24 h 尿液,连苯三酚红钼终点法测定 24 h 尿蛋白量(24 h-Upro);留取结扎侧肾组织行苏木素-伊红(HE)染色,马松(Masson)染色;采用免疫组化法(IHC)检测转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),纤连蛋白(FN), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TGF- β_1 , p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)蛋白表达。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠 24 h-Upro, SCr, BUN 含量明显增高($P < 0.01$),光镜下肾组织损伤严重,TGF- β_1 , FN, α -SMA 含量明显升高($P < 0.05$),TGF- β_1 , p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,大黄蛭虫丸加减大、小剂量组 24 h-Upro, SCr, BUN 明显降低($P < 0.05$),肾脏组织损伤减轻,TGF- β_1 , FN, α -SMA 含量明显降低($P < 0.05$),TGF- β_1 , p-p38 MAPK 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。**结论:**大黄蛭虫丸加减方可通过降低 FN, α -SMA 的高表达,下调 p38 MAPK 信号通路中的 p-p38 MAPK, TGF- β_1 表达,减少细胞外基质过度沉积和肾脏固有细胞损伤来改善肾间质纤维化。

[关键词] 大黄蛭虫丸; 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1); α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA); p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK); 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38 MAPK); 肾间质纤维化

[中图分类号] R289;R692;R587.1;R331.3+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0109-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190736

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181219.1355.002.html>

[网络出版时间] 2018-12-20 15:36

Protective Effect and Mechanism of Modified Dahuang Zhechong Wan on Renal Interstitial Fibrosis in Rats with Obstructive Nephropathy

LI Jun-na¹, MA Hua^{2*}, MA Tian-cheng², TIAN Shu-jie²

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China;

2. Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect and mechanism of modified Dahuang Zhechong Wan on renal interstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. **Method:** The unilateral ureteral ligation (UUO)-induced renal interstitial fibrosis model was adopted, 50 SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, model group, enalapril group (0.001 g·kg⁻¹), and high and low-dose modified Dahuang Zhechong Wan group (19, 9.5 g·kg⁻¹). Rats in each group were put to death on the 15th day after operation. The serum levels of serum creatinine (SCr) and urea nitrogen (BUN) were collected by enzyme method. The 24-hour urine was collected for 24-hour urinary protein quantity (24 h-Upro) by pyrogallol red molybdenum end point. The kidney tissue was removed from the ligated side. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were performed; the expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), fibronectin (FN) and α -smooth actin

[收稿日期] 20181025(002)

[基金项目] 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室项目

[第一作者] 李军娜,在读硕士,从事中西医结合肾脏病研究,E-mail:lijunna@aliyun.com

[通信作者] *马华,主任医师,硕士生导师,从事中西医结合肾脏病研究,E-mail:mahua1022@aliyun.com

(α -SMA) were determined by immunohistochemistry (IHC). Expressions of TGF- β_1 , p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) were detected by Western blot. **Result:** Compared with Sham group, UUO group showed a significant increase in 24 h-Upro, SCr, and BUN ($P < 0.01$), the renal tissue damage was severe under light microscope, and TGF- β_1 , FN, and α -SMA were increased obviously ($P < 0.05$); TGF- β_1 , p38 MAPK, and p-p38 MAPK were increased obviously ($P < 0.05$). Compared with the UUO group, 24 h-Upro, SCr, BUN decreased obviously ($P < 0.05$); renal tissue damage was alleviated; TGF- β_1 , FN and α -SMA decreased obviously ($P < 0.05$); TGF- β_1 and p-p38 decreased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Dahuang Zhechong Wan may improve renal interstitial fibrosis by reducing the high expressions of FN and α -SMA, down-regulating the expressions of p-p38 MAPK and TGF- β_1 in p38 MAPK signaling pathway, and decreasing extracellular matrix over deposition and renal cell damage.

[Key words] modified Dahuang Zhechong Wan; transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); α -smooth muscle actin (α -SMA); p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK); phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK); renal interstitial fibrosis

肾间质纤维化(RIF)是各种慢性肾脏病(CKD)进行性发展的病理基础,其病理机制复杂,涉及肾脏固有细胞的损伤和转分化、炎性细胞的浸润、细胞外基质(ECM)的过度沉积等多个环节^[1-2],导致肾组织进行性损伤和肾功能的逐步丧失而发展为终末期肾衰竭。采取有效的治疗策略延缓 RIF 的进展成为治疗 CKD 的重点方向。大量临床实践和实验研究显示中医药治疗 RIF 可以从不同的作用靶点和信号通路途径发挥作用,说明中医药在治疗 CKD 上具有良好的发展前景^[3-4]。大黄蛭虫丸出自《金匮要略》,多年来被广泛用于肾脏病的临床治疗,如大黄蛭虫丸用于肾病综合征、糖尿病肾病及慢性肾衰竭患者的治疗,并获得良好的临床疗效^[5-6];实验研究中,大黄蛭虫丸通过影响 ECM 降解蛋白酶、血液流变学及微循环发挥抗肾纤维化作用^[7-8];但促肾纤维化的机制复杂且多样,其中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)是肾小管上皮细胞转分化的重要标志物,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)是促肾纤维化的关键细胞因子,且 TGF- β_1 /p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)通路是促 RIF 的主要信号转导通路^[9-11]。对于大黄蛭虫丸是否通过介导该通路来改善 RIF 的机制尚未报道,故本课题组为在临床中更好地运用大黄蛭虫丸治疗 CKD 提供理论及实验依据,在大黄蛭虫丸的基础上,针对 CKD 的病因病机酌加祛湿泄浊扶正之药味,组成为大黄蛭虫丸加减方,制备单侧输尿管结扎(UUO)大鼠模型探讨此方是否通过调节 TGF- β_1 /p38 MAPK 通路发挥对 RIF 的保护作用。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,8~9 周龄,体质量(190±10)g,由山西医科大学实验动

物中心提供,动物合格证号 SCXK(晋)2015-0001。饲养于山西医科大学生理中心动物房,12 h 光照,饲养笼湿度 45% 左右,自由饮食,适应性饲养 1 周后开始实验。本实验获得山西医科大学医学伦理委员会批准,审批号 2018014。

1.2 药物 大黄蛭虫丸加减由大黄 10 g,土鳖虫 6 g,黄芪 15 g,红花 12 g,淫羊藿 12 g,白花蛇舌草 20 g,半枝莲 20 g 组成。饮片均购自北京同仁堂药店,由山西医科大学第二医院中药制剂室副主任张京平鉴定均符合 2015 年版《中国药典》标准。依那普利片,10 mg/片,扬子江药业集团江苏制药股份有限公司,国药准字 H32026567。

1.3 试剂 TGF- β_1 兔单克隆抗体,纤连蛋白(FN)兔单克隆抗体, α -SMA 兔单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab215715, ab199056, ab32575); β -肌动蛋白(β -actin)兔多克隆抗体,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,通用 SP 免疫组化法试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 K101527P, G1120, SP0041);p38 MAPK 兔单克隆抗体,磷酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK)兔单克隆抗体;兔抗免疫球蛋白(Ig)G HRP 连接抗体(美国 CST 公司,批号分别为 8090S, 9211S, 7074S);马松(Masson)染色试剂盒(福州迈新生物公司,批号 MST-8003);脑脊液/尿蛋白测定试剂盒,血肌酐(SCr)检测试剂盒(浙江伊利康生物技术有限公司,货号分别为 R006004, DL009);尿素氮(BUN)测定试剂盒(美国贝克曼库尔特公司, AUZ5718)。

1.4 仪器 CX31-72C02 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);721BR05397 型超高灵敏度化学发光成像系统;170-3930 型湿式转膜仪(美国 Bio-Rad

公司);ZE240 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);ZWY-200D 型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 模型、分组及给药 采用随机数字表法将大鼠分为假手术组,模型组,依那普利组,大黄蛭虫丸加减大、小剂量组,每组 10 只。以 2% 戊巴比妥钠 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,背部左肋脊角处皮肤备皮,消毒,铺无菌手术巾,做一纵行切口,游离左肾及输尿管,在输尿管中段两端各用 4 号缝合线结扎,不剪断输尿管,分层缝合,制备 UUO 大鼠 RIF 模型^[13],假手术组剖腹,分离出左侧输尿管,不结扎。术后第 7 天出现梗阻侧肾脏颜色变浅,体积明显大于对侧,镜下观肾小管扩张,肾间质增宽,说明造模成功^[13]。RIF 模型制备成功后,予以给药。假手术组、模型组给予等体积生理盐水灌胃;大黄蛭虫丸加减人常用量为 $95 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,大鼠给药量按照大鼠与人的体表面积法换算,折算系数为 0.018,得出大黄蛭虫丸大、小剂量分别为 19, $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,依那普利组以依那普利液灌胃,剂量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次,连续 14 d^[12]。

2.2 标本收集与处理 各组大鼠分别于处死前一天用代谢笼收集 24 h 尿液,用于测定 24 h 尿蛋白量(24 h-Upro)。于术后第 15 天采用水合氯醛腹腔注射麻醉后,于心脏取血 2~3 mL,制备血清。左侧肾脏于原位灌流除去血细胞后,沿纵轴切割分成两部分,一部分于 4% 多聚甲醛液中固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,制成 $4 \mu\text{m}$ 切片,其余组织迅速置于液氮中冻存。

2.3 酶法测定 SCr, BUN 含量 各组大鼠心脏取血后, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后分离血清,检测波长为 505 nm,标准品加样 $50 \mu\text{L}$,待测样品孔中加待测样品 $10 \mu\text{L}$,样品稀释液 $40 \mu\text{L}$,采用全自动生化仪测定并读数。

2.4 连苯三酚红铝终点法测定大鼠 24 h-Upro 水平 大鼠处死前 1 d 禁食不禁水 24 h,留取 24 h 尿液,采用全自动生化仪检测,测定参数为波长 600 nm,光径 1 cm。空白管加入蒸馏水 $5 \mu\text{L}$,校准管加入标准液 $5 \mu\text{L}$,测定管加入待测样品 $5 \mu\text{L}$ 混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5 min 后读数。

2.5 HE 染色观察肾脏组织病理变化 以肾间质纤维化、肾小管扩张、炎性细胞浸润 3 个指标来判定肾组织损伤程度。每个指标分 4 个等级:正常,0

分;轻度受损,1 分;中度受损,2 分;重度受损,3 分。每个样本肾组织损伤评分总分为 0~9 分^[14]。

2.6 Masson 染色观察肾脏组织病理变化 每张切片选取 10 个互不重复的肾间质视野,以蓝色胶原沉积为阳性信号,计算胶原容积分数(CVF), $\text{CVF} = \text{胶原面积} / \text{肾小管间质总面积}$ (不包含肾小管管腔面积),取平均值。

2.7 免疫组化法检测 TGF- β_1 , FN, α -SMA 的含量 采用 SABC 法,将石蜡切片脱蜡与水化,3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,抗原修复,5% BSA 封闭液室温下封闭 30 min,分别滴加不同的一抗,TGF- β_1 (1:500), FN (1:1 000), α -SMA (1:500), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,滴加二抗 (1:1 000), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,滴加 SABC 复合液放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱中 30 min,最后加入 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间。苏木素复染,脱水,透明,封片。实验采用 PBS 缓冲液代替一抗的方法作为阴性对照。以组织出现棕黄色或棕褐色颗粒沉积为阳性对照,切片在高倍镜下随机选择 5 个视野,用 Image-pro-plus 图像分析系统测定 TGF- β_1 , FN, α -SMA 阳性表达的灰度值并计算其 A 值。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 TGF- β_1 , p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达 提取组织蛋白,按照组织 20 mg 加入裂解液 $200 \mu\text{L}$,匀浆器匀浆, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心,取上清液。取部分上清液用 BCA 法测量蛋白浓度,按照蛋白 $100 \mu\text{L}$ 加 loading buffer ($5 \times$) $20 \mu\text{L}$ 的比例配制,沸水煮 5 min。按每孔蛋白 $20 \mu\text{g}$ 上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,后转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉液封闭 80 min, TBST 液漂洗后,一抗 p38 MAPK (1:1 000), p-p38 MAPK (1:1 000), TGF- β_1 (1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,二抗 (1:1 500) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,滴加 ECL 试剂显色。同时测定 β -actin (1:1 000) 表达作为参照。每个实验重复 3 批不同样本,用 Image Lab 5.1 软件进行半定量分析。

2.9 统计学方法 运用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的两两比较采用 LSD 检验方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肾功能指标 BUN, SCr, 24 h-Upro 的影响 与假手术组比较,模型组 24 h-Upro, SCr, BUN 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 24 h-Upro, SCr, BUN 含量均明显降低 ($P < 0.05$);大黄蛭虫丸加减大、小剂量组 24 h-Upro,

SCr, BUN 含量呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 大黄蛭虫丸加减方对大鼠 BUN, SCr, 24 h-Upro 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on BUN, SCr, 24 h-Upro in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

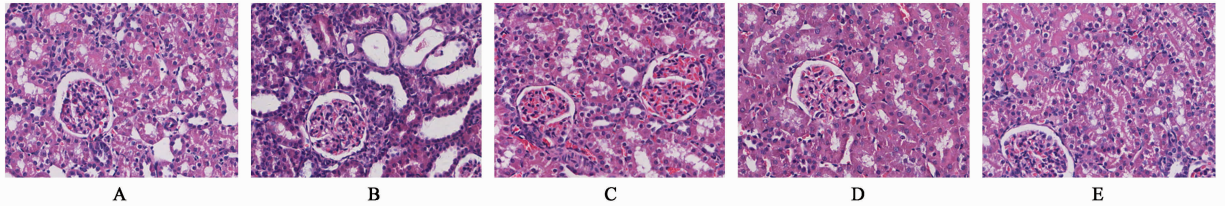
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	SCr /μmol·L ⁻¹	24 h Upro /mg
假手术	-	5.53 ± 0.76	21.50 ± 1.58	1.78 ± 0.55
模型	-	17.99 ± 1.48 ¹⁾	44.90 ± 6.99 ¹⁾	13.01 ± 0.25 ¹⁾
依那普利	0.001	11.16 ± 1.18 ²⁾	30.50 ± 2.99 ²⁾	7.45 ± 0.78 ²⁾
大黄蛭虫丸	19	9.99 ± 1.41 ²⁾	29.30 ± 4.37 ²⁾	7.67 ± 0.33 ²⁾
大黄蛭虫丸加减	9.5	13.24 ± 1.21 ²⁾	38.40 ± 4.99 ²⁾	8.42 ± 0.20 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

3.2 对大鼠肾脏组织病理形态的影响 肉眼观察,假手术组左侧肾脏大小、形态均正常,颜色为深红色,表面光滑,与右侧肾脏无明显差异;模型组与各给药组左侧肾脏体积较右侧增大,肾盂肿大明显,颜色较对侧变浅,皮髓质变薄,内含有较多尿液。

HE 染色结果显示,假手术组肾组织正常;模型组肾小管官腔扩张严重,其上皮细胞扁平、脱落,可见较多上皮细胞空泡样变性,部分肾小管萎缩,肾间质发生纤维化、水肿,可见淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润;各给药组肾组织病变同模型组类似,其程度较模型组减轻,但仍比假手术组病变严重。见图 1。肾组织损伤病理评分结果示,与假手术组比较,模型组肾组织损伤病理评分显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组肾组织损伤病理评分均显著降低 ($P < 0.01$),大黄蛭虫丸加减各剂量组评分呈剂量依赖性降低。见表 2。

Masson 染色结果显示,假手术组肾组织结构正常,肾间质内有少量胶原纤维阳性染色;模型组肾小管、肾间质内可见大量染成蓝色的胶原纤维,呈束状、网状分布,肾小管扩张,部分肾小管萎缩。与模型组比较,各用药组虽有肾小管扩张、萎缩,但蓝色胶原纤维明显减少。见图 2。CVF 结果显示,与假手术组比较,模型组肾胶原容积显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组肾胶原容积显著降低 ($P < 0.01$);大黄蛭虫丸加减各剂量组肾胶原容积呈剂量依赖性降低。见表 2。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 依那普利组; D~E. 大黄蛭虫丸大、小剂量组(图 2~6 同)

图 1 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾间质纤维化的影响(HE, × 200)

Fig. 1 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on renal interstitial fibrosis in rats(HE, × 200)

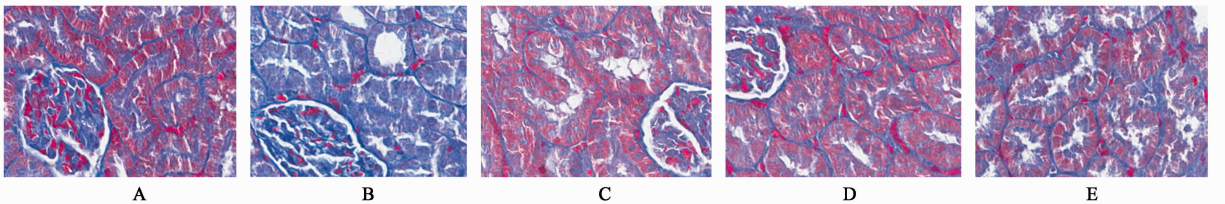


图 2 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾间质纤维化的影响(Masson, × 400)

Fig. 2 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on renal interstitial fibrosis in rats (Masson, × 400)

3.3 对 TGF-β₁, FN, α-SMA 表达的影响 假手术组肾组织 TGF-β₁, FN, α-SMA 含量较少;模型组肾小管上皮细胞与间质区可见 TGF-β₁, α-SMA 广泛表达, FN 主要在肾小球中表达,表现为大量黄褐色颗粒物沉积,各给药组 TGF-β₁, FN, α-SMA 病理表现同模型组类似,其程度较模型组轻,但仍比假手术组病变重。半定量结果分析显示,与假手术组比较,模型组

TGF-β₁, FN, α-SMA 表达明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各用药组 TGF-β₁, FN, α-SMA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3~5,表 3。

3.4 对 TGF-β₁, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组 TGF-β₁, p38 MAPK, p-p38 MAPK 明显增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组 TGF-β₁, p-p38 MAPK 增高 ($P <$

表 2 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾组织病理损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on pathological injury of rat kidney tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肾组织病理损伤程度评分/分	肾胶原容积分数/%
假手术	-	0.25 ± 0.46	4.84 ± 0.74
模型	-	7.00 ± 1.19 ¹⁾	41.75 ± 4.10 ¹⁾
依那普利	0.001	4.63 ± 0.92 ²⁾	19.63 ± 3.20 ²⁾
大黄蛭虫丸加减	19	5.13 ± 1.13 ²⁾	20.40 ± 2.45 ²⁾
	9.5	6.00 ± 1.07 ²⁾	29.75 ± 2.49 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

0.05); 中药组 TGF- β_1 , p-p38 MAPK 呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$); 依那普利组与大剂量组比较 TGF- β_1 , p-p38 MAPK 无明显差异; 而模型组和各用药组之间 p38 的表达无明显差异, 由此说明大黄蛭虫丸加减方能降低 TGF- β_1 , p-p38 MAPK 蛋白表达, 减轻肾间质纤维化。见图 6, 表 4。

4 讨论

RIF 是伴随 CKD 发展的一种病理表现, 可归属于腰痛、虚劳范畴。在 CKD 的病程中, 肾虚为发病之本, 一则肾虚卫外之能减弱, 外邪易乘虚而入; 二则肾虚气化无权, 化生水湿; 三则肾虚不易驱邪

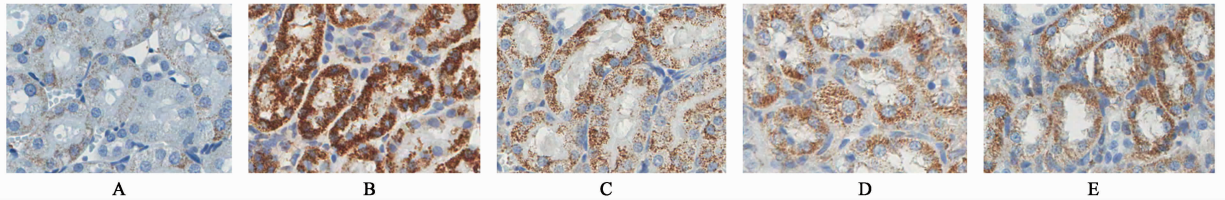


图 3 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾组织 TGF- β_1 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on expression of TGF- β_1 in rat kidney tissue (IHC, $\times 400$)

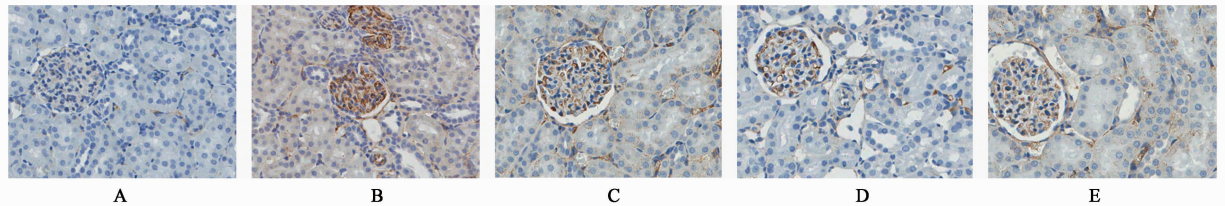


图 4 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾组织 FN 表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on expression of FN in rat kidney tissue (IHC, $\times 200$)

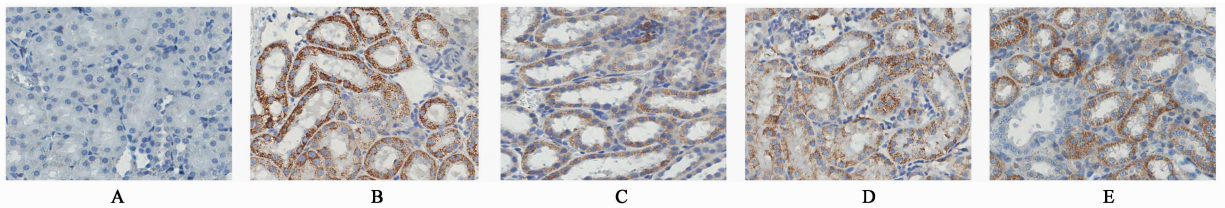


图 5 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾组织 α -SMA 表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on expression of α -SMA in rat kidney tissue (IHC, $\times 200$)

外出。《丹溪心法》云:“血受湿热, 久必凝滞。”肾病迁延不愈, 湿浊蕴结, 气机不畅, 则易生瘀血, 故肾虚湿瘀是 CKD 的基本病机, 治疗当以扶助正气, 清利湿浊, 活血化瘀为法, 方用大黄蛭虫丸加减方治疗。方中大黄与土鳖虫 (即蛭虫) 活血祛瘀, 破血通络功强而力专, 为主药; 加用黄芪, 一则益气以助活血, 气行则血行; 二则益气健脾, 培土以制水; 红花活血消癥, 祛瘀生新; 白花蛇舌草、半枝莲清利湿热; 少佐淫羊藿温肾助阳以助气化。全方集活血、祛湿、清热、

扶正于一方, 攻补并行, 使邪去正安, 肾病自除。经多年临床实践验证其能减少蛋白尿, 改善肾功能, 但发挥作用的内在机制尚不明了, 故制备 UUO 大鼠模型来探讨大黄蛭虫丸加减方对 RIF 发挥作用的机制。

RIF 的主要特征是 ECM 的过度沉积、肾固有细胞的转分化和肾功能下降, 发病机制涉及多种细胞因子和血管活性物质。其中 FN 是一种非胶原性的 $\alpha 2$ 糖蛋白, 为 ECM 的主要组成成分, 主要由成纤维

表 3 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾组织 TGF-β₁, FN, α-SMA 蛋白表达积分吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of modified Duhuang Zhechong Wan on IA expressions of TGF-β₁, FN, α-SMA in rat kidney tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TGF-β ₁	FN	α-SMA
假手术	-	0.140 ± 0.192	0.138 ± 0.005	0.143 ± 0.005
模型	-	0.247 ± 0.005 ¹⁾	0.189 ± 0.013 ¹⁾	0.301 ± 0.020 ¹⁾
依那普利	0.001	0.163 ± 0.007 ²⁾	0.154 ± 0.010 ²⁾	0.234 ± 0.017 ²⁾
大黄蛭虫丸	19	0.181 ± 0.140 ^{2,3)}	0.164 ± 0.010 ²⁾	0.226 ± 0.020 ²⁾
加减	9.5	0.217 ± 0.109	0.180 ± 0.005	0.247 ± 0.012

注:与假手术组比较¹⁾ P < 0.05;与模型组比较²⁾ P < 0.05。

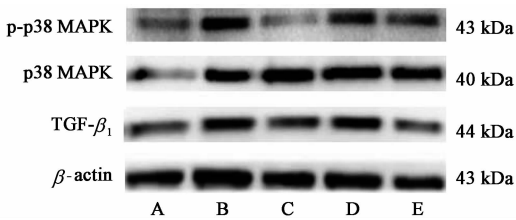


图 6 大黄蛭虫丸加减方对大鼠肾组织 TGF-β₁, p38 MAPK, p-p38 MAPK 表达的影响

Fig. 6 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on expressions of TGF-β₁, p38 MAPK, p-p38 MAPK in rat kidney tissue

表 4 大黄蛭虫丸加减方对 UUO 大鼠肾组织 TGF-β₁, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of modified Dahuang Zhechong Wan on protein expressions of TGF-β₁, p38 MAPK and p-p38 MAPK in UUO rat kidney tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TGF-β ₁ /β-actin	p38 MAPK /β-actin	p-p38 MAPK /β-actin
假手术	-	0.19 ± 0.30	1.00 ± 0.32	0.09 ± 0.02
模型	-	0.40 ± 0.16 ¹⁾	2.10 ± 0.22 ¹⁾	0.31 ± 0.02 ¹⁾
依那普利	0.001	0.25 ± 0.22 ²⁾	1.94 ± 0.30	0.16 ± 0.02 ²⁾
大黄蛭虫丸	19	0.24 ± 0.29 ²⁾	1.88 ± 0.24	0.16 ± 0.03 ²⁾
加减	9.5	0.34 ± 0.15	1.94 ± 0.18	0.22 ± 0.03

细胞合成,具有结合纤维蛋白、纤维蛋白原和胶原的作用,是其他胶原在肾小管和间质沉积的决定因素。研究表明 FN 在正常肾组织中微量表达,而在肾病中出现早且表达量高,被认为是促肾纤维化的重要因素^[14]。RIF 的发生发展与成纤维细胞的转分化有密切关系,在生理条件下,合成和分泌 ECM 的主要细胞为成纤维细胞,在病理状态下成纤维细胞会发生功能和表型的转变,转分化为表达 α-SMA 的肌成纤维细胞 (MFB),MFB 产生 ECM 的能力比成

纤维细胞显著增强,能生成大量的 ECM,同时也可分泌过多的 TGF-β₁^[15-16]。TGF-β₁ 贯穿于 RIF 的始终,不仅能刺激成纤维细胞合成 ECM,促进肾小管上皮细胞去分化为 MFB,从而使肾固有细胞减少,而且对 ECM 的多种降解酶活性具有抑制作用,加重肾组织损伤,进而使肾功能减退^[17-18]。本研究通过 UUO 模型观察大黄蛭虫丸加减方对大鼠 RIF 的影响,结果发现,与假手术组比较,模型组血清 BUN, SCr 显著升高,说明肾功能明显下降;从肾组织病理损伤来看,模型组肾小管官腔扩张严重,部分肾小管萎缩,大量炎性细胞浸润,说明肾组织结构损伤严重;Masson 染色显示,模型组肾小管、肾间质内大量胶原纤维沉积,且 FN, α-SMA, TGF-β₁ 表达量明显升高,说明 ECM 增多,肾固有细胞发生转型。而与模型组比较,大黄蛭虫丸大剂量组在一定程度上能降低 BUN, SCr 的水平,下调 FN, α-SMA, TGF-β₁ 的高表达,且肾组织结构损伤和胶原纤维沉积程度均明显减轻。说明大黄蛭虫丸可以改善肾功能,减少 ECM 的过度沉积,保护肾组织,从而减轻 RIF。

此外由 TGF-β₁ 介导的 TGF-β₁/p38 MAPK 通路在促肾纤维化中发挥着重要作用,研究表明该通路是一条正负反馈调节通路,能介导炎症反应和 ECM 生成^[19-20]。p38 MAPK 通路的传导具有三级激酶级联反应的特点,即 MAPK 激酶被磷酸化,激活的 MAPK 激酶可将信号传递至 MAPK 激酶并将其活化,MAPKK 能将苏氨酸/酪氨酸磷酸化而活化 p38 MAPK 成为 p-p38 MAPK,后者进入到细胞核中,介导致纤维化作用最强的细胞因子 TGF-β₁ 的表达^[21-22]。TGF-β₁ 也可作为 p38 MAPK 通路的上游因子诱导其活化,促进炎症反应和 ECM 的生成,导致肾组织的病理损害^[23]。基于此,课题组研究了大黄蛭虫丸加减方是否在体内通过下调肾组织中 TGF-β₁, p-p38 MAPK 的表达从而达到改善 RIF 的目的。结果显示, RIF 模型鼠肾组织 TGF-β₁, p-p38 MAPK 蛋白表达水平上调,同时镜下观大量淋巴细胞、单核细胞浸润,胶原纤维沉积,肾组织损伤程度评分、CVF 显著升高,经大黄蛭虫丸加减方干预后 TGF-β₁, p-p38 MAPK 表达水平降低,相应的肾组织损伤程度也减轻,而且经相关性分析肾组织损伤程度评分, TGF-β₁ 蛋白表达水平与 p-p38 MAPK 表达呈正相关。据此推断, RIF 模型鼠中 p38 MAPK 通路活化后,使核内 p-p38 MAPK 升高,后者促进 TGF-β₁ 基因的过度转录和翻译,加剧 ECM 的沉积和炎症反应,而大黄蛭虫丸加减方的加入能阻断 p-p38

MAPK 的表达,从而减少下游 TGF- β_1 的表达,而减少的 TGF- β_1 对 p38 MAPK 通路的反馈调节作用也随之减弱,最终改善 RIF。这可能是大黄蛭虫丸加减方减轻 RIF 模型鼠 ECM 沉积和炎性细胞浸润的机制之一。

综上所述,通过单侧输尿管梗阻致大鼠肾间质纤维化模型说明大黄蛭虫丸加减方能够改善肾间质纤维化,其作用机制可能与降低血清 BUN,SCr 水平,下调 FN, α -SMA, TGF- β_1 的表达,降低肾组织 p38 MAPK 信号通路中 p-p38 MAPK, TGF- β_1 蛋白活性,从而减少肾脏 ECM 过度积聚和炎性细胞浸润,保护肾脏固有细胞有关。

[参考文献]

[1] LIU Y H. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12): 684-696.

[2] 张浩洋, 庞立健, 刘创, 等. 基于慢性复杂性疾病“络虚邪瘀”理论探讨器官纤维化共性病机及治疗[J]. *中医杂志*, 2017, 58(18): 1562-1565.

[3] 赵先锋. 中医药治疗慢性肾衰竭研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(2): 217-220.

[4] 齐堃, 张彧, 杨仁义, 等. 中医方药调控肾纤维化相关信号通路的研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(9): 1044-1048.

[5] 乔汉连. 厄贝沙坦联合大黄蛭虫丸治疗早期糖尿病肾病 34 例总结[J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(10): 63-64.

[6] 邓艳芳. 大黄蛭虫丸与病、证关系的文献研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[7] 陈继红, 孙伟, 周栋, 等. 大黄蛭虫丸对肾小球硬化大鼠纤溶酶原激活物抑制物 1 和金属蛋白酶 1 组织抑制剂 mRNA 表达的影响[J]. *中西医结合学报*, 2008(5): 512-516.

[8] 吕小燕, 刘强, 苏娟萍, 等. 大黄蛭虫丸对肾间质纤维化大鼠血液流变学及微循环的影响[J]. *中国药物与临床*, 2012, 12(5): 585-587.

[9] 鲁华, 林海英. TGF- β_1 /p38 MAPK 通路在介导单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化过程中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(20): 4448-4450.

[10] 王永胜, 杨丽霞, 程涛, 等. 糖尿病肾病的炎症致病机制与中药防治[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 200-207.

[11] 袁金凤, 陈兰英, 王慧玲, 等. 金匱肾气丸对腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 149-156.

[12] 徐淑云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北

京: 人民卫生出版社, 2002: 203-206.

[13] 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): 1477-1488.

[14] 程红新, 杨晓萍, 蒋雅红, 等. 纤维连接蛋白在肾间质纤维化大鼠肾组织中的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(31): 5837-5842.

[15] Eddy A A. The origin of scar-forming kidney myofibroblasts[J]. *Nat Med*, 2013, 19(8): 964-966.

[16] SHEN Y, MIAO N, WANG B, et al. C-myc promotes renal fibrosis by inducing integrin α v-mediated transforming growth factor- β signaling[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(4): 888-899.

[17] 陈升平, 李红霞. ERK1/2 信号通路参与人滋养层细胞中转化生长因子- β_1 对 MMP-9 表达的抑制作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(6): 658-666.

[18] Omori K, Hattori N, Senoo T, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates transforming growth factor- β -dependent epithelial mesenchymal transition and differentiation of fibroblasts to myofibroblasts[J]. *PLoS One*, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0148969. eCollection 2016.

[19] Das D, Holmes A, Murphy G A, et al. TGF-beta1-induced MAPK activation promotes collagen synthesis, nodule formation, redox stress and cellular senescence in porcine aortic valve interstitial cells[J]. *J Heart Valve Dis*, 2013, 22(5): 621-630.

[20] Pourreynon C, CHEN M, Mcgrath J A, et al. High levels of type VII collagen expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa cutaneous squamous cell carcinoma keratinocytes increases PI3K and MAPK signalling, cell migration and invasion[J]. *Br J Dermatol*, 2014, 170(6): 1256-1265.

[21] Ono K, HAN J. The p38 signal transduction pathway: activation and function[J]. *Cell Signal*, 2000, 12(1): 1-13.

[22] 黄燕如, 万毅刚, 孙伟, 等. 雷公藤多苷调节肾组织 p38 MAPK 信号通路改善糖尿病肾病肾小球炎症性损伤的作用和机制[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(21): 4102-4109.

[23] HONG F, WU N, GE Y, et al. Nanosized titanium dioxide resulted in the activation of TGF- β /Smads/p38 MAPK pathway in renal inflammation and fibration of mice[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(6): 1452-1461.

[责任编辑 孙丛丛]