

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.01.014

实验研究

肾络通对梗阻性肾病大鼠炎性介质及血清糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 表达的影响

王 箐, 梁丽娟, 王聪慧, 王 蕊, 许庆友*

(河北医科大学中西医结合学院, 河北省石家庄市新石南路 326 号, 050091)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273684); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20111323110008); 河北省自然科学基金资助项目 (C2011206042)

摘要 目的 探讨肾络通拮抗肾间质纤维化的可能机制。方法 将 48 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、依普利酮组和肾络通组, 每组 12 只。除假手术组外, 其余各组大鼠结扎左侧输尿管造成梗阻性肾病大鼠模型, 依普利酮组每天灌胃依普利酮 100 mg/kg, 肾络通组每天灌胃肾络通 26 g/kg, 治疗 10 天, 假手术组及模型组灌胃等体积生理盐水。观察各组大鼠肾脏组织形态学改变, 检测血清醛固酮、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白介素-1 β (IL-1 β)、血清糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 (SGK-1) 及其 mRNA 表达情况。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠肾脏胶原沉积显著增加, 大量炎性细胞浸润; 血清醛固酮、TNF- α 、iNOS、IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); SGK-1 mRNA 及蛋白表达明显增强 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 肾络通组、依普利酮组胶原沉积及炎性细胞浸润均减轻, 血清 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 含量明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SGK-1 mRNA 及蛋白水平明显下调 ($P < 0.01$); 肾络通组血清醛固酮含量亦减少 ($P < 0.01$)。结论 肾络通能减缓梗阻性肾病模型大鼠肾间质纤维化进程, 其可能机制为通过阻断 SGK-1 信号通路抑制醛固酮活性, 从而减轻炎症损伤及炎性介质的表达。

关键词 肾间质纤维化; 炎症因子; 肾络通; 糖皮质激素诱导蛋白激酶 1

炎症损伤在慢性疾病持续进展中发挥重要作用, 故抗炎治疗对于慢性疾病的预后具有重要意义^[1]。这种炎症损伤并非单纯由外界感染所致, 而是以内源性炎症损伤为主, 与肾小管间质纤维化 (RIF) 的持续进展密切相关^[2]。随着对肾素—血管紧张素—醛固酮系统 (RAAS) 的深入研究, 发现醛固酮也可通过血清糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 (SGK-1) 和核因子 κ B (NF- κ B)、氧化应激等多种途径导致肾脏炎症浸润和细胞外基质积聚, 最终导致 RIF 的进展^[3]。本实验观察梗阻性肾病大鼠 SGK-1 信号转导通路的变化, 以及肾络通对血清醛固酮及相关炎性介质的调控作用, 初步探讨其拮抗 RIF 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠 48 只, 体重 (180 $\pm$

20) g, 购自河北医科大学动物实验中心, 动物合格证号: SCXK (冀) 1205069。

1.2 药物与试剂

依普利酮由诺华公司提供 (批号: 107724-20-9)。中药肾络通 (组成: 黄芪 15 g, 蝉蜕 10 g, 地龙 12 g, 僵蚕 10 g, 乌梢蛇肉 10 g, 丹参 15 g, 川芎 10 g, 鳖甲 15 g 等), 由河北省石家庄市乐仁堂制成生药含量 0.33 g/ml 的中药煎剂。醛固酮 (批号: RA21207)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) (批号: 1207B) 放射免疫试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司。诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 放射免疫试剂盒 (批号: 20121116) 购自南京建成生物工程研究所。白细胞介素-1 β (IL-1 β) 放射免疫试剂盒 (批号: 20120323) 购自上海江莱生物科技有限公司。SGK 抗体 (批号: AJ1712a) 购自 Cell Signaling Technology。

1.3 动物模型制备

大鼠梗阻性肾病模型制备参照文献 [4]。造

* 通讯作者: qingyouxu@sohu.com, (0311) 86265272

模动物给予 10% 水合氯醛麻醉后,于左侧中腹部切开皮肤,游离左侧输尿管,分别在输尿管上 1/3 处和中 1/3 处用丝线结扎,切断输尿管,逐层缝合皮肤。假手术组仅将输尿管游离但不结扎离断。

1.4 分组及给药

将 48 只 Wistar 大鼠以随机数字表法分为假手术组、模型组、依普利酮组和肾络通组 4 组,每组 12 只。造模后依普利酮组灌胃依普利酮 100 mg/(kg·d),肾络通组灌胃肾络通 26 g/(kg·d),治疗 10 天,假手术组及模型组灌胃等体积生理盐水。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 肾脏组织形态学检测 各组大鼠灌胃 10 天后,迅速摘取梗阻侧肾脏,除去被膜,称重,部分组织置于 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋,行 HE、Masson 染色。

1.5.2 血清 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 及醛固酮测定

所有大鼠禁食 12 h,断头取血,留取血清标本,采用放射免疫法测定 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 及醛固酮水平。

1.5.3 肾组织 SGK-1 mRNA 测定 采用 Real-time PCR 测定。提取 RNA,反转录 cDNA 后扩增。引物由 Invitrogen 公司合成。SGK-1 引物序列为:上游引物: 5'-TAGCAATCCTCATCGCTTTC-3';下游引物: 5'-GAGTTGTTGGCAAGCTTCTG-3'。 β -actin 引物序列为:上游引物: 5'-TGCCTGACGGTCAG-GTCA-3';下游引物: 5'-CAGGAAGGAAGGCTG-GAAG-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 变性 2 min, 95℃ 15 s, 退火温度 34 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 50℃ 变性 2 min。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析基因表达相对变化。

1.5.4 肾组织 SGK-1 蛋白测定 采用 Western blot 测定。冰冻肾组织给以裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取并测定蛋白含量;取样品按比例加入 loading buffer 95℃ 煮沸 5 min 后待电泳;配制 SDS-PAGE 胶,上样蛋白 20 μ g,电泳 90V 到底;0.22 μ m PVDF 膜(甲醛处理),20V,40 min 半干转;5% 脱脂牛奶封闭 2~4 h,加入一抗(1:1000),4℃

过夜, TBST 清洗 3 次,每次 10 min;加入二抗(1:20000),室温 60 min, TBST 清洗 3 次,每次 10 min, TBS 清洗 10 min 后显影,所得结果给以内部校正。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本均数间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏组织形态学比较

HE 染色结果显示,除假手术组大鼠外其余各组梗阻肾出现不同程度的肾盂扩张,肾间质水肿及肾小管扩张,肾小管上皮细胞浊肿、坏死,其中模型组最为显著,伴有间质大量炎性细胞浸润;依普利酮组及肾络通组小管扩张及上皮细胞水肿坏死与模型组基本相同,但炎性细胞浸润明显减轻。Masson 染色结果显示,假手术组有少量胶原纤维表达,可见于肾小球/肾小管基底膜及肾间质;模型组肾脏结构紊乱,胶原成分显著增多,以肾间质为主;依普利酮组及肾络通组胶原纤维表达较假手术组增多,但与模型组相比明显减少。

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 及醛固酮水平比较

表 1 示,模型组血清 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、醛固酮含量均较假手术组增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。依普利酮组及肾络通组血清 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 含量较模型组显著减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。依普利酮组血清醛固酮含量与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肾络通组血清醛固酮含量与模型组比较明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肾组织 SGK-1 mRNA 及蛋白表达比较

表 2 示,模型组大鼠肾组织 SGK-1 mRNA 及蛋

表 1 各组大鼠血清 iNOS、IL-1 β 、TNF- α 、醛固酮水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	iNOS (U/ml)	IL-1 β (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)	醛固酮 (pg/ml)
假手术组	12	26.34 $\pm$ 2.117	0.17 $\pm$ 0.028	4.42 $\pm$ 0.26	249.6 $\pm$ 83.2
模型组	12	29.36 $\pm$ 2.727*	0.22 $\pm$ 0.035**	4.71 $\pm$ 0.30*	502.9 $\pm$ 114.5**
依普利酮组	12	23.54 $\pm$ 2.728 $\Delta\Delta$	0.17 $\pm$ 0.019 $\Delta\Delta$	4.27 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$	457.2 $\pm$ 125.5
肾络通组	12	24.52 $\pm$ 1.547 $\Delta\Delta$	0.18 $\pm$ 0.018 $\Delta\Delta$	4.32 $\pm$ 0.35 Δ	281.5 $\pm$ 87.5 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

白表达较假手术组明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。依普利酮组及肾络通组 SGK-1 mRNA 及蛋白表达与模型组比较均显著下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠肾组织 SGK-1 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SGK-1 mRNA	SGK-1 蛋白
假手术组	12	1.00 ± 0.081	0.1 ± 0.068
模型组	12	2.19 ± 0.032*	1.2 ± 0.322*
依普利酮组	12	1.35 ± 0.066 [△]	0.5 ± 0.118 [△]
肾络通组	12	1.19 ± 0.027 [△]	0.7 ± 0.145 [△]

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

先天性或获得性泌尿系梗阻所致的梗阻性肾病是儿童慢性肾功能衰竭的首要原因, 也是成人慢性肾功能衰竭的主要原因^[5]。RIF 为梗阻性肾病典型病理表现, 其形成是一缓慢的动态过程, 早期主要以炎性细胞浸润、致纤维化细胞因子释放以及局部成纤维细胞的增殖为主, 继而肾小管上皮细胞等表型转化、细胞凋亡或细胞过度增殖, 最终细胞外基质在肾间质积聚^[6]。根据“病久必虚”、“病久必瘀”、“病久入络”的中医理论结合临床实践, 认为细胞外基质在肾组织中的大量积聚, 属于病久瘀血入于肾络、肾络瘀阻所致。瘀血内阻, 宜当活血化瘀, 然病久之邪已属陈积, 又深居于络, 非一般活血之品所能及, 结合本病病机特点, 须用性喜走窜、善入络脉, 既能活血化瘀、又能消癥通络的虫类药物, 可引诸药入络, 使药达病所。因此, 本实验选用具有益气活血通络的肾络通作为治疗方剂, 扶正祛邪, 标本兼治。

肾络通是河北医科大学赵玉庸教授的经验方, 方中蝉蜕、地龙、僵蚕、乌梢蛇性喜走窜, 善入络脉, 搜风祛痰, 化瘀通络; 川芎活血行气、丹参养血活血; 鳖甲软坚散结; 又因久病多虚, 加黄芪扶助正气以抗邪。诸药相伍通补并用、标本兼顾。临床研究表明, 肾络通在治疗慢性肾炎、IgA 肾病以及慢性肾功能衰竭等方面具有较好的疗效^[7-8]。在体及细胞培养证实, 肾络通可以通过抑制细胞增殖、抑制转化生长因子- β (TGF- β) 的过度表达以保护肾功能^[9]。

既往研究证实, 炎性因子 IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 是各种慢性肾脏疾病中引起肾脏炎症和纤维化的重要因素^[10]。醛固酮调节水钠代谢不仅对血液

动力学有调控作用, 亦可引起氧化应激、炎症损伤^[11]。近年来大量的证据显示, 醛固酮及盐皮质激素受体 (MR) 可通过氧化应激、激活 SGK-1 和 NF- κ B 等多种途径诱导肾脏炎症因子表达和炎症细胞浸润, 导致严重的肾间质炎症浸润和纤维化^[12], 故阻断醛固酮可能具有肾脏保护作用。本研究结果显示, 依普利酮和肾络通可以抑制醛固酮的效应, 下调 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 等炎性介质表达, 减缓 RIF 进展, 进而减轻肾脏损伤。依普利酮组血清醛固酮含量显著升高, 但与模型组无明显差异, 这可能是由于依普利酮阻断醛固酮与其受体结合所致, 虽然含量增高但不能发挥其生物作用, 切断其诱导炎性损伤的途径。

研究表明, SGK-1 不仅在醛固酮调节水钠代谢中有重要作用^[13], 在醛固酮活化诱导炎性损伤和炎性因子的进程中也发挥关键作用^[14], 在梗阻性肾病大鼠肾组织中有高表达^[15], 提示 SGK-1 是醛固酮导致的肾脏纤维化和炎症损伤的效应介质^[16]。本实验结果显示, 依普利酮组及肾络通组醛固酮活性被抑制, iNOS、IL-1 β 、TNF- α 等炎性介质下调的同时, SGK-1 的表达也受到抑制, 提示 SGK-1 可能是醛固酮介导炎症损伤的效应介质, 同时也提示 SGK-1 信号转导通路是参与梗阻性肾病间质纤维化的重要途径。肾络通对 SGK-1 具有一定的抑制作用, 对 SGK-1 信号转导通路的抑制可能成为今后干预梗阻性肾病进展的一个新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities [J]. Science, 2013, 339(6116): 166-172.
- [2] Grande MT, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM. Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy [J]. J Inflamm (Lond), 2010, 7(19): 1-14.
- [3] Fukuda S, Horimai C, Harada K, et al. Aldosterone-induced kidney injury is mediated by NF κ B activation [J]. Clin Exp Nephrol, 2011, 15(1): 41-49.
- [4] Iwai T, Kitamoto K, Teramoto K, et al. Cobalt protoporphyrin attenuates rat obstructive nephropathy: role of cellular infiltration [J]. Urology, 2008, 72(2): 432-438.
- [5] Grande MT, Lopez-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy [J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 5(6): 319-328.
- [6] 陈孝文, 刘华峰. 从肾小管-间质纤维化发病机制探讨其中西医结合防治新策略 [J]. 中国中西医结合肾病杂志

- 志, 2008, 9(1): 1-4.
- [7] 王聪慧, 王箐, 丁英钧, 等. 赵玉庸治疗 IgA 肾病经验 [J]. 中医杂志, 2012, 53(8): 645-646.
- [8] 王月华, 董绍英, 丁英钧, 等. 赵玉庸辨治慢性肾功能衰竭经验 [J]. 中医杂志, 2011, 52(12): 1000-1001.
- [9] 王亚利, 赵玉庸, 陈志强, 等. 肾络通对大鼠系膜细胞外基质分泌及转化生长因子表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 2(3): 201-203.
- [10] Zheng D, Wang Y, Cao Q, et al. Transfused macrophages ameliorate pancreatic and renal injury in murine diabetes mellitus [J]. Nephron Exp Nephrol, 2011, 118(4): 87-99.
- [11] Wagman G, Fudim M, Kosmas CE, et al. The neurohormonal network in the RAAS can bend before breaking [J]. Curr Heart Fail Rep, 2012, 9(2): 81-91.
- [12] Sun GP, Kohno M, Guo P, et al. Involvements of Rho-kinase and TGF beta pathways in aldosterone-induced renal injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(8): 2193-2201.
- [13] McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, et al. SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption [J]. Physiology (Bethesda), 2005, 20: 134-139.
- [14] 张彬, 王全胜, 朱锐, 等. 血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1 在梗阻性肾病肾小球中的表达及姜黄素对其的影响 [J]. 医学研究生学报, 2008, 21(3): 245-248.
- [15] Cheng J, Truong LD, Wu X, et al. Serum and glucocorticoid regulated kinase 1 is upregulated following unilateral ureteral obstruction causing epithelial-mesenchymal transition [J]. Kidney Int, 2010, 78(7): 668-678.
- [16] Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, et al. Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 298-309.

Effects of *Shenluotong* on Inflammatory Mediators and Serum Glucocorticoid-Induced Protein Kinase 1 in Rats With Obstructive Nephropathy

WANG Zheng, LIANG Lijuan, WANG Conghui, WANG Rui, XU Qingyou

(Hebei Medical University, Hebei Province 050091)

ABSTRACT Objective To investigate the effects and mechanism of *Shenluotong* (decoction to free the kidney vessels) on renal interstitial fibrosis. **Methods** Totally 48 female Wistar rats were randomized into the sham operation group, model group, eplerenone group and *Shenluotong* group, with 12 in each. The renal interstitial fibrosis models were established by ligation of the left ureter in all groups except the sham operation group after one week of adaptive feeding. The rats in the eplerenone group and *Shenluotong* group were gavaged with 100 mg/kg eplerenone and 26 g/kg *Shenluotong* respectively for 10 days. The rats in the sham operation group and model group were gavaged with the same volume of normal saline. The morphological changes and the levels of serum aldosterone, tumor necrosis factor- α (TNF- α), induced nitric oxide synthase (iNOS), interleukin 1 β (IL-1 β), serum glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK-1) mRNA and serum glucocorticoid-induced protein kinase 1 SGK-1 were observed. **Results**

Comparing with the sham operation group, renal pathology showed a significant increment of collagen deposition and inflammatory cell infiltration, the levels of serum aldosterone, TNF- α , iNOS and IL-1 β ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and the expressions of SGK-1 mRNA and SGK-1 ($P < 0.01$) were significantly increased in the model group. Comparing with the model group, the renal collagen deposition, inflammatory cell infiltration, the levels of TNF- α , iNOS and IL-1 β ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and the expressions of SGK-1 mRNA and SGK-1 ($P < 0.01$) were significantly decreased in the *Shenluotong* group and eplerenone group ($P < 0.01$) and the serum aldosterone level was significantly decreased in the *Shenluotong* group as well ($P < 0.01$). **Conclusion** *Shenluotong* can delay the process of renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy, which may be associated with inhibiting the activity of aldosterone by blocking SGK-1 signal and reducing inflammatory injury and the expression of inflammatory mediators.

Keywords renal interstitial fibrosis; inflammatory cytokines; *Shenluotong* (decoction to free the kidney vessels); serum glucocorticoid-induced protein kinase 1

(收稿日期: 2013-07-22; 修回日期: 2013-10-08)

编辑: 洪 涛