

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.02.015

黄芪、丹参有效单体对慢性肾功能衰竭大鼠肾组织转化生长因子 $\beta 1$ 和结缔组织生长因子 mRNA 的影响唐英¹, 朱祎², 王东², 何立群^{*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海市普安路 185 号, 200021; 2. 上海中医药大学)

基金项目: 国家“重大新药创制”专项项目 (2009ZX09311-003); 上海市教育委员会 E-研究院建设计划资助项目 (E03008); 上海高校创新团队建设项目

摘要 目的 探讨黄芪、丹参有效单体黄芪甲苷和丹参多酚酸 A 干预慢性肾功能衰竭 (CRF) 的可能作用机制。方法 40 只 SD 大鼠通过 5/6 肾切除建立 CRF 动物模型, 根据血肌酐 (Cr) 值随机分为模型组、黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组及科素亚组各 10 只, 并设正常组 10 只。黄芪甲苷组给予黄芪甲苷 1.4 mg/(kg·d), 丹参多酚酸 A 组给予丹参多酚酸 A 17.1 mg/(kg·d), 科素亚组给予科素亚 8.6 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组和正常组予等量蒸馏水灌胃。8 周后测定各组大鼠血清 Cr、尿素氮 (BUN) 水平, 并检测肾组织转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) mRNA 及结缔组织生长因子 (CTGF) mRNA 的表达。结果 黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组血清 Cr、BUN 较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组、科素亚组肾组织 TGF- $\beta 1$ 、CTGF mRNA 较模型组亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。丹参多酚酸 A 组在降低 BUN、Cr 方面优于科素亚组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 黄芪甲苷、丹参多酚酸 A 可能通过抑制肾组织 TGF- $\beta 1$ 、CTGF mRNA 的表达, 降低血清 Cr、BUN 水平, 从而延缓 CRF 肾功能衰竭的恶化。

关键词 慢性肾功能衰竭; 肾纤维化; 黄芪甲苷; 丹参多酚酸 A; 转化生长因子- $\beta 1$; 结缔组织生长因子

肾纤维化是慢性肾功能衰竭 (CRF) 发病的主要病理基础之一, 是慢性肾脏病发展至终末期的最终结果, 包括肾小球硬化和肾间质纤维化^[1-3]。既往中医药在抗纤维化方面的研究多集中在中药复方和单味药的干预作用, 近年来随着对中药有效成分研究的深入, 中药有效单体在肾纤维化治疗中的作用日益受到重视。本研究以中药黄芪、丹参的有效单体黄芪甲苷、丹参多酚酸 A 对 CRF 大鼠进行干预, 探讨其对肾纤维化的干预作用及机制。

1.1 材料

1.1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 (180 ± 20) g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2008-0016。

1.1.2 药物

黄芪甲苷 (批号: 110702)、丹参多酚酸 A

(批号: 110420) 购自上海融禾医药科技有限公司。科素亚 (国药准字 H20000371), 由杭州默沙东制药有限公司提供。

1.3 主要试剂及仪器

血肌酐 (Cr, 批号: 20110526)、尿素氮 (BUN, 批号: 20110615) 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。Trizol 法全 RNA 抽提试剂盒: Invitrogen 公司生产, 货号: A2010B0A02; cDNA 第一链合成试剂盒: Promega 公司生产, 货号: A2010B0B01; 荧光定量 PCR 试剂盒: BioTNT 公司生产, 货号: A2010A0112。MultiskanEx 酶标仪 (上海志研生物科技有限公司); VIIA7 Real-time 检测仪 (美国 ABI 公司); HB-100 恒温金属浴 (杭州博日科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模方法

50 只 SD 大鼠按随机数字表法选取 10 只作为正常组, 其余 40 只按 Platt 法^[4]建立 CRF 模型。以

* 通讯作者: heliqun59@163.com, (021) 53827100

2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，大鼠俯卧位暴露左肾区，在距左脊肋骨 1.5 cm 处作斜向外方的切口，经后腹膜取出左肾并暴露于外，剥离肾周脂肪及包膜后，弧形切除 2/3 肾组织（主要切除皮质部分）约 0.6 g，消毒棉球压迫止血后，观察切面无活动性出血后复位剩余左肾并缝合。10 天后完全游离右侧肾蒂后结扎，行右肾全摘除。两次手术共切除肾脏约 80%。造模 2 周后大鼠眼内眦取血检测血清 BUN 及 Cr 水平，根据 Cr 水平随机分为模型组、黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组、科素亚组各 10 只，各组间的 Cr 值差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

2.2 给药方法

正常组、模型组予生理盐水 1 ml/d 灌胃。治疗组药物用蒸馏水配制成相应浓度后灌胃，其中黄芪甲苷组按照 1.4 mg/（kg·d）灌胃，丹参多酚酸 A 组按 17.1 mg/（kg·d）灌胃，科素亚组按 8.6 mg/（kg·d）灌胃，各组均给药 8 周。8 周后心脏采血后处死，分离血清备检，并取肾组织放入液氮罐中保存以备测。

2.3 指标检测

2.3.1 Cr、BUN 水平检测 BUN 以二乙酰-脲比色法检测，Cr 以苦味酸法检测。检测方法按照试剂盒说明书进行。

2.3.2 肾组织转化生长因子- $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ）mRNA 和结缔组织生长因子（CTGF）mRNA 检测 取大鼠肾组织，用 Trizol 总试剂盒提取组织 RNA，逆转录合成 cDNA，将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增，扩增体系如下：SYBRGreenMix 32.5 μ l，上游引物 0.5 μ l，下游引物 0.5 μ l，ddH₂O 水 14.5 μ l，cDNA 模板 2 μ l。大鼠 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 及 GAPDH 引物由 Invitrogen 公司合成，序列分别如下：CTGF 引物序列上游为 5'-AACCGTGTGTCATTGTCAT3'，下游为 5'-CACCTTAGTGTGCGTTCTG3'；TGF- $\beta 1$ 引物序列上游为 5'-GAAGACCTGGGTTGGAAGT3'，下游为 5'-CGGGTTGTGTTGTTGTAGAG3'；GAPDH 引物序列上游为 5'-CCTCTATGCCAACACAGT3'，下游为 5'-AGCCACCAATCCACACAG3'。扩增条件：离心混匀后，反应管置于 ABI-7300 型 Real-time 检测仪，PCR 热循环参数为 95℃ 5 min；95℃ 5 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s；30 个循环；72℃ 10 min。进行数据和熔解曲线分析，数据采用仪器自带软件 ABI

Prism 7300 SDS 分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析，计量资料用（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠给药后血清 Cr、BUN 水平比较

表 1 示，与正常组比较，模型组大鼠血清 BUN、Cr 明显升高（ $P < 0.01$ ）。与模型组相比，黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组血清 BUN、Cr 水平明显下降（ $P < 0.01$ ）；科素亚组血清 Cr 水平与模型组比较，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。与科素亚组比较，黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组 BUN 下降明显（ $P < 0.01$ ），丹参多酚酸 A 组血清 Cr 水平亦明显下降（ $P < 0.05$ ）。

表 1 各组 CRF 大鼠血清 Cr、BUN 水平比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	鼠数	BUN（mmol/L）	Cr（ μ mol/L）
正常组	10	6.01 $\pm$ 0.58	25.01 $\pm$ 3.37
模型组	9	10.84 $\pm$ 1.40*	57.57 $\pm$ 5.28*
黄芪甲苷组	10	7.95 $\pm$ 0.57 $\Delta\Delta\#$	46.64 $\pm$ 4.90 $\Delta\Delta$
丹参多酚酸 A 组	10	7.64 $\pm$ 0.80 $\Delta\Delta\#$	42.14 $\pm$ 4.62 $\Delta\Delta\#$
科素亚组	10	9.86 $\pm$ 1.18	47.38 $\pm$ 7.50 Δ

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与科素亚组比较， $\#P < 0.05$ ， $\#P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠肾组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 和 CTGF mRNA 表达水平比较

表 2 示，与正常组比较，模型组大鼠 TGF- $\beta 1$ 、CTGF mRNA 表达水平显著增高（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。与模型组比较，黄芪甲苷组、丹参多酚酸 A 组和科素亚组肾组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 和 CTGF mRNA 的表达均显著降低（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。

表 2 各组 CRF 大鼠肾组织 TGF- $\beta 1$ 、CTGF mRNA 表达水平比较（ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ， $\bar{x} \pm s$ ）

组别	鼠数	TGF- $\beta 1$ mRNA	CTGF mRNA
正常组	10	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.28
模型组	9	1.50 $\pm$ 0.13*	4.05 $\pm$ 0.93**
黄芪甲苷组	10	1.12 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	1.98 $\pm$ 0.90 Δ
丹参多酚酸 A 组	10	0.82 $\pm$ 0.20 $\Delta\Delta$	1.93 $\pm$ 0.75 Δ
科素亚组	10	0.90 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	1.36 $\pm$ 0.63 Δ

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

4 讨论

CRF 属于中医学“关格”、“癃闭”、“水肿”、“虚劳”等范畴。其病机以正虚为本，主要责之于脾肾两脏；瘀血、湿浊（热）、毒邪为标。病至后

期, 由于正气亏虚、脾肾功能失调, 又致水液代谢失司, 湿浊内生, 毒浊内蕴, 湿毒之邪阻滞气机, 以致气机不畅, 气滞血瘀 “久病入络”, “瘀血内结”, 气虚与血瘀往往同时并见。黄芪具有补气升阳、固表止汗、利水消肿等功效。大量研究表明, 黄芪具有改善肾纤维化、保护肾组织的作用^[8-9]。杨蓉等^[9]发现, 黄芪还可使肾小管间质 TGF- β 1、 β ig-h3 (TGF- β 1 的下游分子及活化指标, 现证实其为一种细胞外基质成分) 蛋白及 mRNA 表达明显下调, 延缓肾间质纤维化进展。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分之一。丹参具有活血化瘀、凉血消肿等功效, 丹参多酚酸 A 是唇形科植物丹参的干燥根及根茎中所含的一种水溶性酚酸类化合物^[8], 是丹参的有效成分之一, 具有显著的抗氧化^[10]、心肌缺血保护^[11]、抗血栓^[12]、抗肝纤维化^[12-13]、神经保护和防治糖尿病及并发症等药理活性。李春香等^[14]观察到丹参对实验性 CRF 大鼠肾脏有明显的保护作用。

近年来研究发现, TGF- β 是迄今已知作用最强的一种促肾纤维化的细胞因子, 具有调节细胞的增殖、分泌、迁移和凋亡等多种生物学活性^[15]。CTGF 是一种新发现的细胞因子, 作为 TGF- β 介导的肾间质纤维化的重要下游效应因子, 其表达与 TGF- β 1 伴随升高, 且其表达与纤维化程度呈正相关^[16]。

本研究表明, 黄芪甲苷、丹参多酚酸 A 可降低 5/6 肾切除 CRF 大鼠血清 BUN、Cr 水平, 且黄芪甲苷、丹参多酚酸 A 可减轻肾组织中 TGF- β 1 及 CTGF mRNA 的表达。提示黄芪甲苷、丹参多酚酸 A 通过抑制肾组织 TGF- β 1、CTGF mRNA 的表达, 降低血清 Cr、BUN 含量, 改善肾脏纤维化, 从而起到延缓 CRF 肾功能恶化的作用。

参考文献

- [1] Zeisberg M, Strutz F, Müller GA. Renal fibrosis: an update [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(3): 315-320.
- [2] Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis [J]. Hypertension, 2001, 38(3/2): 635-638.
- [3] 何立群, 郑平东, 陈刚. 大鼠肾大部切除诱发慢性肾衰竭模型的建立 [J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(1): 11-13.
- [4] 牟姗, 王琴, 施蓓莉, 等. 高糖对肾小管上皮细胞胶原分泌和 PAI-1 合成的影响以及黄芪的调控作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(1): 11-14.
- [5] 魏佳莉, 王畅, 彭佑铭, 等. 黄芪对人肾小管上皮细胞细胞外基质分泌的研究及其机制探讨 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(8): 664-667.
- [6] 肖敏, 李会娟, 谢席胜, 等. 黄芪通过 c-met 调控 TGF β 诱导的肾小管上皮细胞转分化 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(9): 764-768.
- [7] 杨蓉, 倪兆慧, 钱家麒, 等. 人类转化生长因子 β 诱导基因-克隆 3 在糖尿病大鼠肾组织中的表达以及洛沙坦和黄芪对其影响 [J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(5): 347-350.
- [8] Li LN, Tan R, Chen WM. Salvianolic acid A, a new depside from roots of Salvia miltiorrhiza [J]. Planta Med, 1984, 50(3): 227-228.
- [9] Wang XJ, Wang ZB, Xu JX. Effect of salvianic acid A on lipid peroxidation and membrane permeability in mitochondria [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 97(3): 441-445.
- [10] 杨秀颖, 强桂芬, 张莉, 等. 丹酚酸 A 对缺血/再灌注心肌的保护作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8): 1072-1076.
- [11] Fan HY, Fu FH, Yang MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A [J]. Thromb Res, 2010, 126(1): 17-22.
- [12] Wu ZM, Wen T, Tan YF, et al. Effects of salvianolic acid A on oxidative stress and liver injury induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 100(2): 115-120.
- [13] 王晓玲, 刘平, 刘成海, 等. 丹酚酸 A 对成纤维细胞活力、增殖及胶原合成的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2000, 10(1): 24-25.
- [14] 李春香, 张艳玲, 顾连方. 丹参对慢性肾衰竭大鼠肾脏细胞凋亡及 Fas-FasL 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2002, 3(2): 101-102.
- [15] 姚春萌, 郭汉城, 刘俊兰, 等. 全反式维甲酸对糖尿病大鼠肾脏组织 BMP-7 表达及细胞外基质代谢的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 21(2): 7-12.
- [16] Frazier KS, Paredes A, Dube P, et al. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation [J]. Vet Pathol, 2000, 37(4): 328-335.

Effects of Astragaloside and Salvianolateon A on TGF- β 1 mRNA and CTGF mRNA in Renal Tissue of Chronic Renal Failure Rats

TANG Ying¹, ZHU Yi², WANG Dong², HE Liqun¹

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021; 2. Shanghai University of TCM)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of Astragaloside and Salvianolateon A for chronic renal failure (CRF). **Methods** The CRF models were established by 5/6 nephrectomy in Sprague Dawley (SD) rats. The rat models were randomized into the model group, Astragaloside group, Salvianolateon A group and Cozaar group according to the serum creatinine (SCr) value, with 10 in each. Another 10 rats were selected as the normal group. The Astragaloside group, Salvianolateon A group and Cozaar group was gavaged with 1.4 mg/(kg · d) Astragaloside, 17.1 mg/(kg · d) Salvianolateon A and 8.6 mg/(kg · d) Cozaar respectively. The model group and normal group were gavaged with the same amount of distilled water. The levels of SCr and blood urea nitrogen (BUN) were detected 8 weeks later. The expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) mRNA were detected. **Results** Comparing with the model group, the levels of SCr and BUN in the Astragaloside group and Salvianolateon A group were significantly decreased ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the expressions of TGF- β 1 and CTGF mRNA in the Astragaloside group, Salvianolateon A group and Cozaar group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Salvianolateon A group was superior to the Cozaar group in decreasing BUN and SCr ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Astragaloside and Salvianolateon A can slow the progression of renal failure probably by inhibiting the expressions of TGF- β 1 and CTGF mRNA and decreasing the levels of SCr and BUN.

Keywords chronic renal failure; renal fibrosis; Astragaloside; Salvianolateon A; transforming growth factor- β 1; connective tissue growth factor

(收稿日期: 2013-06-18; 修回日期: 2013-10-08)

编辑: 洪 涛

欢迎邮购 《中医杂志》

2000 年 2-12 期, 每册 5.80 元, 合订本 85 元; 2001 年 2-12 期, 每册 6.50 元, 合订本 95 元; 2002 年 1-12 期, 每册 6.80 元; 2003 年 1-12 期, 每册 6.80 元, 合订本 105 元; 2004 年 1、2 期、4-12 期, 每册 6.80 元, 合订本 115 元; 2005 年 1-7、9、11、12 期, 每册 6.80 元, 合订本 125 元; 2006 年 1-12 期, 每册 7.30 元, 合订本 135 元; 2007 年 2-12 期, 每册 8.80 元; 2008 年 2-12 期, 每册 9.80 元; 2009、2010 年每册 9.80 元。2007-2010 年合订本每年 140 元。2011 年 (半月刊), 每册 9.80 元 (缺 5、6 期), 2011 年合订本 (每季度 1 本, 共 4 本) 280 元, 2012 年合订本 (每季度 1 本, 共 4 本) 280 元。2013 年上半年合订本 (每季度 1 本, 共 2 本) 140 元。《中医杂志》2006-2009 年增刊每

册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部, 邮编: 100700, 电话: (010) 64014411-3036。

欢迎邮购 《中医杂志》 光盘合订本

1951-1986 年 (4 张光盘) 480 元; 1987-1994 年 (1 张光盘) 260 元; 1995-2004 年 (1 张光盘) 280 元。光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632

网址: <http://www.jtcm.net.cn>