

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.07.018

六味地黄汤对慢性肾功能衰竭大鼠 TGF- β 1 和 BMP-7 蛋白表达的影响

陈 丽¹, 周忠志², 何泽云^{2*}

(1. 湖南中医药大学病理教研室, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院)

基金项目: 湖南省科技计划资助项目 (ZYYDX014); 湖南省中医药科研计划资助项目 (2011042); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2010B337)

摘要 目的 观察六味地黄汤对慢性肾功能衰竭 (CRF) 大鼠肾小管上皮细胞-间充质转化 (EMT) 的影响。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分正常组 10 只, 假手术组 10 只, 模型组 20 只, 六味地黄汤组 20 只, 模型组和六味地黄汤组进行 5/6 肾切除手术建立 CRF 大鼠模型, 假手术组分离肾被膜不切除肾脏, 正常组不作任何处理。六味地黄汤组予以六味地黄汤灌胃 [给药 6.75 g/(kg·d)], 其余各组以等体积蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 共给药 8 周。用免疫组织化学、Western Blot、RT-PCR 方法检测各组大鼠肾组织转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和骨形成蛋白-7 (BMP-7) 及其 mRNA 表达的差异。结果 与假手术组比较, 模型组 TGF- β 1 和 BMP-7 蛋白表达面密度值增加 ($P < 0.01$), 平均灰度值降低 ($P < 0.01$), TGF- β 1 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.01$), BMP-7 mRNA 表达水平下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 六味地黄汤组 TGF- β 1 表达面密度值降低, 平均灰度值增加 ($P < 0.01$), BMP-7 表达面密度值增加, 平均灰度值降低 ($P < 0.01$), TGF- β 1 mRNA 表达水平下调, BMP-7 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.01$)。结论 六味地黄汤通过下调 TGF- β 1 蛋白及其 mRNA 表达水平, 上调 BMP-7 蛋白及其 mRNA 表达水平, 抑制 CRF 大鼠肾小管的 EMT, 可能是抗肾间质纤维化的作用机制。

关键词 六味地黄汤; 慢性肾功能衰竭; 转化生长因子- β 1; 骨形成蛋白-7

慢性肾功能衰竭 (chronic renal failure, CRF) 是危害人类的重大疾病之一, 肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 是 CRF 的主要病理改变, 肾小管上皮细胞-间充质转化 (EMT) 是形成 RIF 的关键环节^[1-2]。研究发现, 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和骨形成蛋白-7 (BMP-7) 与 EMT 的发生存在密切关系^[3-5]。我们前期研究发现, 六味地黄汤可抑制 RIF^[6-7], 本研究通过检测 CRF 大鼠模型 TGF- β 1、BMP-7 蛋白及其 mRNA 的表达水平, 探讨 RIF 的发生机理, 同时观察六味地黄汤的干预机制, 为其临床提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只, 体重 (180 $\pm$ 20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2011-0003。

1.2 药物

六味地黄汤组成: 熟地黄 24 g、山萸肉 12 g、山药 12 g、牡丹皮 9 g、泽泻 9 g、茯苓 9 g, 药材由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。常规煎煮药物, 过滤收集煎液, 水浴恒温器上浓缩至含生药 1 g/ml, 4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂和仪器

兔抗大鼠 TGF- β 1 试剂盒 (Bioassay Technology Laboratory, 批号: ZA-0234); 兔抗大鼠 BMP-7 试剂盒 (Bioassay Technology Laboratory, 批号: 93-9550); TEMED (美国 Sigma 公司, 批号: 1568A14); RT-PCR 试剂盒、TaqDNA 聚合酶、dNTPs (美国 Fermentas 公司, 批号: EP0041); 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号: A3500)。

生物显微镜 (德国 Motic 麦克奥迪实业集团有限公司, 型号: BA410T); 数码显微图像分析系统软件 (德国 Motic 麦克奥迪实业集团有限公司, 型号: Motic Medical 6.0); 电泳仪 (英国 Pharmacia

* 通讯作者: hzywj2003@yahoo.com.cn, (0731) 85600718

Biotech 公司, 型号: MultiphorII Nova); 分光光度计 (上海第三分析仪器厂, 型号: 721B); PCR 仪 (美国 Perkin Elmer 股份有限公司, 型号: 2400); 紫外分光核酸蛋白蛋白分析仪 (美国 Beckman 公司, 型号: DU700); 电泳凝胶图像分析仪 (上海 Tanon 公司, 型号 Tanon-4100); 电泳转膜仪 (美国 Hoefer 公司, 型号: TE52X-230V)。

1.4 造模与分组

60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为正常组 10 只、假手术组 10 只、模型组 20 只、六味地黄汤组 20 只。参照文献 [8] 方法模型组和六味地黄汤组均在无菌条件下进行 5/6 肾切除术 (肾切除术分 2 次完成) 建立 CRF 大鼠模型, 假手术组分离肾被膜不切除肾脏, 正常组不作任何处理。六味地黄汤组予以六味地黄汤灌胃 [生药 6.75 g / (kg · d)] ; 模型组、假手术组和正常组给予等体积蒸馏水灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续给药 8 周后, 处死动物, 取肾组织。

1.5 指标检测与方法

1.5.1 免疫组织化学检测 TGF- β 1、BMP-7 蛋白表达 常规固定、脱水、包埋、切片; 一抗 TGF- β 1 (1 : 200)、BMP-7 (1 : 100), 37℃ 孵育 2 h; 生物素标记二抗, 37℃ 孵育 15 min; DAB 显色; 苏木素轻度复染、脱水透明、封片。采用 Motie Medical 6.0 数码显微图像分析系统软件分析, 每张切片随机选取 5 个视野, 测量面密度值 (目标总面积/统计场面积) 及平均灰度值, 取平均值进行分析。

取新鲜组织 20 ~ 40 mg 剪碎, 以裂解液置冰充分匀浆, 冰浴 10 min, 4℃ 12000 r/min 离心 15 min, 收集总蛋白。Lowry 法蛋白定量, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 再转移至硝酸纤维素膜, 封闭 2 h, 分别加一抗兔抗大鼠 TGF- β 1 (工作浓度 1 : 2000)、BMP-7 (1 : 1000) 4℃ 孵育过夜, 依次经二抗、ECL 化学发光后用 Typhoon 分子成像系统 (Amersham Biosciences 公司) 分析灰度, 以 β -actin 蛋白作为内参, 分别计算 TGF- β 1/ β -actin 及 BMP-7/ β -actin 灰度比值。

1.5.2 RT-PCR 方法检测 TGF- β 1 mRNA、BMP-7 mRNA 表达 TGF- β 1 和 BMP-7 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。TGF- β 1 上游引物 5'-CAACAATTCTGCGCTTACC-3', 下游引物 5'-AGGCATTGCTGATGATCTTG-3'; BMP-7 上游引物 5'-GGCGAGGAGCCAACAGACCAAG-3', 下游引物 5'-CGGAATGTGCCGAATGAAAG-3'; β -actin 上游引物 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', 下游引物

5'-AGGCATTGCTGATGATCTTG-3'。TRI-pure 试剂盒提取大鼠肾组织总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书方法进行逆转录, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应, 总体系 15 μ l, 94℃ 变性 5 min, 循环采用 94℃ 变性 0.5 min, 56℃ 退火 0.5 min, 72℃ 延伸 0.5 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 存放; 电泳分析: 凝胶成像系统中观察, 拍照, 以 β -actin 蛋白作为内参, 分别计算 TGF- β 1 mRNA/ β -actin 及 BMP-7 mRNA/ β -actin 灰度比值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 满足正态分布时, 若方差齐用方差分析, 若方差不齐用校正方差分析; 不满足正态分布时, 用非参数检验。

2 结果

模型组大鼠死亡 6 只, 六味地黄汤组大鼠死亡 3 只。

2.1 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 和 BMP-7 形态学比较

正常组和假手术组肾小球、肾小管均无 TGF- β 1 蛋白的表达; 模型组肾被膜纤维、肾小球、肾小管上皮细胞胞浆、肾间质内均有大量棕黄色物质沉积, 着色深且着色面积大, TGF- β 1 蛋白显著增多; 六味地黄汤组肾被膜纤维、肾小球、肾小管上皮细胞胞浆、肾间质内棕黄色物质减少, 着色变浅且着色面积较小, TGF- β 1 表达减少。

正常组和假手术组肾近曲小管内、肾间质均无 BMP-7 蛋白的表达; 肾小球内皮细胞胞浆、肾远曲小管细胞胞浆及细胞核均有大量棕黄色物质沉积, 着色深且着色面积大, BMP-7 蛋白表达明显。模型组肾小球内无 BMP-7 蛋白表达; 部分被膜纤维、肾近曲小管细胞胞浆、基底膜、肾远曲小管胞浆及细胞核有少量 BMP-7 蛋白表达; 肾间质肌成纤维细胞、血管内皮细胞内有大量棕黄色物质沉积, 着色深且着色面积大, BMP-7 蛋白表达明显; 六味地黄汤组肾小管上皮细胞胞浆、基底膜、肾近曲小管无 BMP-7 蛋白表达; 被膜纤维 BMP-7 蛋白表达较少、肾小球内、肾远曲小管胞浆、核内表达较多, 肾间质肌成纤维细胞、血管内皮细胞内有大量棕黄色物质沉积, 着色深且着色面积大。

2.2 各组大鼠肾组织 TGF- β 1、BMP-7 面密度值及平均灰度值比较

表 1 示, 假手术组与正常组比较, TGF- β 1 和 BMP-7 表达面密度值及平均灰度值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与假手术组比较, 模型组 TGF-

表 1 各组大鼠肾组织 TGF- β 1、BMP-7 面密度值及平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- β 1		BMP-7	
		面密度值 (%)	平均灰度值	面密度值 (%)	平均灰度值
正常组	10	0.83 $\pm$ 0.02	142.00 $\pm$ 21.20	74.15 $\pm$ 5.00	74.60 $\pm$ 11.38
假手术组	10	0.91 $\pm$ 0.01	146.63 $\pm$ 20.98	71.87 $\pm$ 5.56	75.00 $\pm$ 10.97
模型组	14	78.09 $\pm$ 3.10*	107.01 $\pm$ 13.55*	7.13 $\pm$ 0.27*	150.30 $\pm$ 22.56*
六味地黄汤组	17	11.79 $\pm$ 0.89 Δ	124.40 $\pm$ 12.93 Δ	53.78 $\pm$ 2.90 Δ	109.00 $\pm$ 11.25 Δ

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

β 1、BMP-7 表达面密度值增加,平均灰度值降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,六味地黄汤组 TGF- β 1 表达面密度值降低,平均灰度值增加;BMP-7 表达面密度值增加,平均灰度值降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肾组织 GF- β 1 和 TGF- β 1 蛋白表达比较

表 2 示,假手术组与正常组比较,TGF- β 1 和 BMP-7 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组 TGF- β 1 表达明显增高,BMP-7 表达明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),与模型组比较,六味地黄汤组 TGF- β 1 表达降低,BMP-7 表达增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 和 BMP-7 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- β 1/ β -actin	BMP-7/ β -actin
正常组	10	2.3610 $\pm$ 0.0016	7.5770 $\pm$ 0.0043
假手术组	10	2.3693 $\pm$ 0.0051	7.5750 $\pm$ 0.00144
模型组	14	9.8847 $\pm$ 0.0022*	1.8341 $\pm$ 0.0041*
六味地黄汤组	17	6.0789 $\pm$ 0.0039 Δ	3.8462 $\pm$ 0.0038 Δ

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

2.4 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 mRNA 和 BMP-7 mRNA 比较

表 3 示,假手术组与正常组比较,TGF- β 1 mRNA 和 BMP-7 mRNA 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组 TGF- β 1 mRNA 明显增高,BMP-7 mRNA 明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,六味地黄汤组 TGF- β 1 mRNA 降低,BMP-7 mRNA 增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 mRNA 和 BMP-7 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- β 1 mRNA/ β -actin	BMP-7 mRNA/ β -actin
正常组	10	0.2978 $\pm$ 0.0058	1.4456 $\pm$ 0.0037
假手术组	10	0.3049 $\pm$ 0.0061	1.4488 $\pm$ 0.0046
模型组	14	1.1839 $\pm$ 0.0072*	0.8897 $\pm$ 0.0058*
六味地黄汤组	17	0.5530 $\pm$ 0.0041 Δ	1.0370 $\pm$ 0.0029 Δ

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

3 讨论

研究发现,TGF- β 1 是诱导 EMT 最重要的细胞因子^[9-10],其诱导 EMT 的过程也是在病理状态下导致肾间质纤维化的主要途径。EMT 过程也可受多种因素的抑制,BMP-7 是一种在胚胎期肾脏发育过程中调控间充质向上皮细胞转化的重要细胞因子^[11]。体外研究表明 BMP-7 能够拮抗 TGF- β 的致肾纤维化作用,其活性减低可能会促进肾纤维化的发生^[12]。研究显示,BMP-7 可逆转 TGF- β 诱导的 EMT,外源性 BMP-7 可拮抗 TGF- β 1 的作用,诱导基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 表达,减少 RIF,同时可诱导 E-钙粘蛋白的重新表达,进而逆转 TGF- β 1 诱导的 EMT^[13]。

我们既往研究发现,六味地黄汤是临床上治疗肾阴虚证型慢性肾小球肾炎、慢性肾脏病及慢性肾功能衰竭的有效方剂^[14-17];给予 5/6 肾切除大鼠灌胃六味地黄汤 8 周后,其血清尿素氮、肌酐的水平明显低于模型组,并能减少留存肾系膜细胞的增生及间质纤维化,使肾切除大鼠生存期延长^[18-19]。

本研究结果显示,模型组大鼠肾组织 TGF- β 1 蛋白及 mRNA 水平表达明显增加,而 BMP-7 蛋白及 mRNA 水平表达明显减少 ($P < 0.01$),表明 EMT 的发生与 TGF- β 1、BMP-7 相关;形态学观察发现,肾小管上皮 EMT 过程中 TGF- β 1 表达明显增高,BMP-7 表达明显降低。六味地黄汤组大鼠肾组织 TGF- β 1 蛋白及 mRNA 水平表达明显降低,BMP-7 蛋白及 mRNA 水平表达明显增加,表明六味地黄汤可能通过下调 TGF- β 1、上调 BMP-7 表达,抑制和减轻肾小管上皮细胞 EMT 的发生,从而达到减轻和延缓肾纤维化,保护肾脏功能的作用。

参考文献

- [1] 张凤霞,万建新,许艳芳.肾脏纤维化中间充质转分化的新观点[J].临床肾脏病杂志,2011,11(4):187-189.
- [2] Winbanks CE,Darby IA,Kelnyack KJ,et al. Explanting is an ex vivo model of renal epithelial-mesenchymal transition[J]. J Biomed Biotechnol,2011:212819. doi: 10.1155/2011/212819.
- [3] 程吉东.六味地黄丸对老年性高血压患者肾保护作用

的随访调查 [J]. 山东中医杂志, 2007, 26(2): 87-89.

[6] 刘卿, 周于禄, 裴奇, 等. 六味地黄丸对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 40-43.

[7] 陈峰, 季晖, 吴建杨, 等. 六味地黄丸对肾脏近曲小管超微结构作用的定量研究 [J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(8): 496-499.

[8] 彭亚军, 张继波, 何泽云, 等. 六味地黄丸对单侧输尿管结扎大鼠肾间质 MCP-1 及 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(7): 587-589.

[9] 李万斌, 何泽云. 六味地黄丸延缓 5/6 肾切除大鼠肾组织纤维化研究 [J]. 中国药师, 2009, 12(4): 411-413.

[10] SM Shea, Raskova J, Morrison AB. A stereologic study of glomerular hypertrophy in the subtotal nephrectomized rat [J]. Am J pathol, 1978, 90(1): 201-210.

[11] Song JS, Kang CM, Park CK, et al. Inhibitory effect of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on the TGF- β -induced alveolar epithelial to mesenchymal transition [J]. Exp Mol Med, 2011, 43(9): 517-524.

[12] Hills CE, Siamantouras E, Smith SW, et al. TGF- β modulates cell-to-cell communication in early epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Diabetologia, 2012, 55(3): 812-824.

[13] Archdeacon P, Deteiler RK. Bone morphogenetic protein-7 (BMP7): a critical role in kidney development and a putative modulator of kidney injury [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2008, 15(3): 314-320.

[14] Motazed R, Colville-Nash P, Kwan JT, et al. BMP-7 and proximal tubule epithelial cells: activation of multiple signaling pathways reveals a novel anti-fibrotic mechanism [J]. Pharm Res, 2008, 25(10): 2240-2246.

[15] Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury [J]. Nat Med, 2003, 9(7): 964-968.

[16] 何泽云, 徐元美. 六味地黄丸治疗肾阴虚型慢性肾小球肾炎的临床研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(1): 35-37.

[17] 彭亚军, 何泽云. 六味地黄丸方治疗肾脏病研究进展 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(7): 1151-1152.

[18] 何泽云, 陶文强. 从地黄丸的发展看肾衰竭的治疗 [J]. 中华现代中医学杂志, 2008, 4(2): 119-121.

[19] 黄仁发, 史伟, 吴金玉, 等. 怡肾汤治疗慢性肾衰竭的疗效观察及对免疫功能的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 52-54.

[20] 何泽云, 陈江华, 李晓峰. 六味地黄丸对肾切除大鼠肾小球化生的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(2): 1-3.

[21] 蔡惠芳, 谭元生, 何泽云, 等. 六味地黄丸对大鼠 5/6 肾切除肾功能的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 17-19.

Effects of *Liuwei Dihuang Decoction* (六味地黄汤) on TGF- β 1 and BMP-7 in Rats With Chronic Renal Failure CHEN Li¹, ZHOU Zhongzhi², HE Zeyun²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province 410208; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effects of *Liuwei Dihuang Decoction* (Six-Ingredient Rehmannia Decoction, 六味地黄汤) on the tubular epithelial-mesenchymal transformation (EMT) in rats with chronic renal failure (CRF). **Methods** Sixty SD rats were randomized into the normal group ($n = 10$), sham operation group ($n = 10$), model group ($n = 20$) and *Liuwei Dihuang Decoction* group ($n = 20$). The CRF models were established with 5/6 nephrectomy in the model group and *Liuwei Dihuang Decoction* group. The renal capsule was isolated in the sham operation group without removal of the kidney. There was no treatment in the normal group. The *Liuwei Dihuang Decoction* group was gavaged with *Liuwei Dihuang Decoction* [6.75 g/(kg · d) raw drug]. The other groups were gavaged with an equal volume of distilled water once daily for 8 weeks. The expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), TGF- β 1 mRNA, bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and BMP-7 mRNA were detected with immunohistochemistry, Western Blot and RT-PCR. **Results** Comparing with the sham operation group, the expressions of TGF- β 1 and TGF- β 1 mRNA were significantly increased but the expressions of BMP-7 and BMP-7 mRNA were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the expressions of TGF- β 1 and TGF- β 1 mRNA were significantly decreased but the expressions of BMP-7 and BMP-7 mRNA were significantly increased in the *Liuwei Dihuang Decoction* group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Liuwei Dihuang Decoction* (六味地黄汤) can inhibit tubular EMT in rats with CRF possibly by decreasing the expressions of TGF- β 1 and TGF- β 1 mRNA and increasing the expressions of BMP-7 and BMP-7 mRNA, which may be its mechanism of anti-renal interstitial fibrosis.

Keywords *Liuwei Dihuang Decoction* (六味地黄汤); chronic renal failure; transforming growth factor- β 1; bone morphogenetic protein-7

(收稿日期: 2013-07-26; 修回日期: 2013-11-25)

编辑: 洪 潮