

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.17.016

益肾化瘀方对单侧输尿管结扎大鼠转化生长因子 $\beta 1$ 、Smad7 信号蛋白表达的影响

张琳琪^{*}, 赵永钦², 刘瑞勇³

(1. 河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450000; 2. 河南省长垣县人民医院; 3. 郑州市人民医院)

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究项目 (2011A360023); 河南省基础与前沿技术研究项目 (102300410124)

摘要 目的 探讨益肾化瘀方抗肾间质纤维化的可能作用机制。方法 108 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、缬沙坦组和益肾化瘀方高、中、低剂量组, 每组 18 只。除假手术组外其余大鼠采用单侧输尿管结扎方法建立肾间质纤维化模型, 造模次日益肾化瘀方高、中、低剂量组分别予益肾化瘀方浓缩液 32、16、8 g/(kg·d) 灌胃, 缬沙坦组予缬沙坦溶液 13.3 mg/(kg·d) 灌胃, 假手术组、模型组予生理盐水 20 ml/(kg·d) 灌胃, 各组均连续灌胃 28 天。分别于造模后第 7、14、28 天观察大鼠肾组织病理改变, 计算肾间质纤维化面积, 检测大鼠肾组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、Smad7 信号蛋白的表达。结果 模型组大鼠出现肾间质炎细胞浸润和梭形核细胞增生, 伴局灶性肾间质纤维化, 各治疗组肾脏病理表现均有不同程度的减轻, 其中益肾化瘀方高剂量组病理改变与缬沙坦组相当。与同时时间点假手术组比较, 其余各组大鼠肾间质纤维化面积、TGF- $\beta 1$ 升高, Smad7 信号蛋白减少 ($P < 0.01$); 与同时时间点模型组比较, 除益肾化瘀方低剂量组外, 其余各治疗组大鼠肾间质纤维化面积、TGF- $\beta 1$ 降低, Smad7 信号蛋白增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且以益肾化瘀方高剂量组和缬沙坦组改善最明显 ($P < 0.05$)。结论 益肾化瘀方可能通过抑制大鼠肾组织中 TGF- $\beta 1$ 的高表达, 上调 Smad7 的表达, 从而减轻肾间质纤维化。

关键词 益肾化瘀方; 单侧输尿管结扎; 肾间质纤维化; 转化生长因子 $\beta 1$; Smad7 信号蛋白

肾间质纤维化是各种慢性肾脏疾病进行性发展的必经之路和不可逆的病理改变, 已成为反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标^[1]。转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 高表达是肾间质纤维化形成的中心环节, TGF- $\beta 1$ /Smad 信号途径是肾间质纤维化主要和最终的共同通路^[2], 有效切断其信号转导是减轻和终止肾纤维化的关键治疗措施之一。益肾化瘀方是基于慢性肾脏病“肾虚血瘀”理论而组方, 前期研究证实其具有一定的拮抗肾间质纤维化作用^[3]。本课题采用单侧输尿管结扎 (UUO) 建立肾间质纤维化模型, 观察益肾化瘀方对 UUO 模型大鼠肾组织病理及 TGF- $\beta 1$ 、Smad7 蛋白表达的调控效应, 进一步探讨该方拮抗肾间质纤维化的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 108 只, 6~8 周龄, 体重 180~220 g, 购自河南省动物实验中心, 实验动物许可

证号: SCXK (豫) 2010-0002。

1.2 实验药物

益肾化瘀方 (药物组成: 黄芪 30 g、菟丝子 15 g、熟大黄 10 g、丹参 30 g、莪术 10 g) 购于河南中医学院第一附属医院, 水煎浓缩为含生药 1.6 g/ml、0.8 g/ml、0.4 g/ml。缬沙坦胶囊由北京诺华制药有限公司生产 (批号: X1193), 以蒸馏水配制为 0.08 mg/ml 溶液。

1.3 主要试剂及仪器

TGF- $\beta 1$ 兔抗大鼠多克隆抗体 (批号 1714116)、Smad7 兔抗大鼠多克隆抗体 (批号 Y-C1-05D15C)、均购自武汉博士德生物工程有限公司。Qwin Plus 图像分析系统, 德国 Leica 公司。

1.4 动物分组与造模

采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、缬沙坦组和益肾化瘀方高、中、低剂量组, 每组 18 只。除假手术组外, 其余各组大鼠参照文献 [4] 建立 UUO 大鼠模型: 予 10% 水合氯醛 (0.04 ml/kg) 腹腔注射后选择左侧背部脊柱肋下约 1.0 cm 为切口, 依次切开皮肤、肌层至腹腔,

* 通讯作者: zllq971688@126.com, (0371) 66231932

游离肾脏及输尿管。将左侧输尿管分离后托起中段部位，在两端用 4.0 缝合线两次结扎近肾盂段，剪断输尿管，纳肾于原位。逐层缝合腹壁切口并消毒，即成功制备 UUO 模型。假手术组手术入路方式同 UUO 组，进腹腔后分离左侧输尿管但不结扎。

1.5 给药方组

于造模后次日开始，假手术组、模型组予生理盐水 20 ml/ (kg · d) 灌胃，益肾化瘀方高、中、低剂量组分别予益肾化瘀方浓缩液 32 g/ (kg · d) 、16 g/ (kg · d) 、8 g/ (kg · d) 灌胃，缬沙坦组予缬沙坦溶液 13.3 mg/ (kg · d) 灌胃。每日 1 次，每周称体重调整药量。

1.6 观察指标与方法

各组大鼠分别于术后 7、14、28 天取材，每组 6 只。麻醉大鼠，取部分左肾组织入 4% 多聚甲醛固定。①肾组织病理学观察。肾组织常规脱水包埋，连续切片，常规 HE、Masson 染色，光学显微镜下观察病理学变化并计算肾间质纤维化面积。②免疫组织化学方法检测 TGF-β1、Smad7 的表达。石蜡切片梯度脱水，抗原修复，添加一抗、二抗，DAB 显色，盐酸酒精分化，梯度酒精脱水，透明，封片。每一切片随机取 5 个不重叠的高倍视野 (×200) ，光镜下观察组织切片细胞中呈棕黄色或棕褐色，分布在细胞膜和胞浆中，以胞浆为主，测定肾间质中 TGF-β1、Smad7 的阳性表达量，计算标本的平均吸光度值 (OD 值) ，采用图像分析系统进行半定量分析。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计学处理，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 One-way ANOVA 和重复测量方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织病理变化

肾组织 HE 及 Masson 染色显示，模型组大鼠自梗阻 7 天即出现肾小管上皮细胞脱落、呈空泡样

变性，肾间质水肿、弥漫性炎细胞浸润和梭形核细胞增生，伴局灶性肾间质纤维化。随着梗阻时间延长，至 14 天时肾小管弥漫性扩张或萎缩、塌陷，肾小管基底膜结构不完整，部分肾小管和间质结构消失，肾小球数目明显减少，面积缩小。28 天上述病理改变更重，肾间质纤维化呈进展性趋势。各给药组病理表现均有不同程度的减轻，间质炎细胞浸润减少，肾小管扩张或萎缩减轻，肾小球数量无明显改变。益肾化瘀方高剂量组肾脏病理改变与缬沙坦组相当。

2.2 各组大鼠不同时间肾间质纤维化面积比较

表 1 示，造模后各组大鼠肾间质纤维化面积随着梗阻时间延长逐渐增大，与同时间点假手术组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) ；与同时间点模型组比较，各给药组肾间质纤维化面积均有明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ；且益肾化瘀方高剂量组各时间点肾间质纤维化面积均明显小于益肾化瘀方中、低剂量组 ($P < 0.05$) 。

2.3 各组大鼠不同时间肾组织中 TGF-β1、Smad7 表达比较

表 2 示，造模后各组大鼠均出现 TGF-β1 的高表达，与同时间点假手术组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ；与同时间点模型组比较，除益肾化瘀方低剂量组外，其余各给药组 TGF-β1 表达均有明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ；且益肾化瘀方高剂量组 TGF-β1 表达均明显低于益肾化瘀方低剂量组各时间点及益肾化瘀方中剂量组第 14 天 ($P < 0.05$) 。

表 3 示，造模后各组大鼠 Smad7 阳性表达随梗阻时间延长逐渐减少，与同时间点假手术组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ；各给药组与同时间点模型组比较，Smad7 表达均有明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ；与益肾化瘀方高剂量组比较，除益肾化瘀方中剂量组 7 天外，益肾化瘀方中、低剂量组各时间点 Smad7 表达降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 。

表 1 各组大鼠不同时间肾间质纤维化面积比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	28 d
假手术组	6	1.01 ± 0.78	1.69 ± 0.89	1.94 ± 1.41
模型组	6	21.95 ± 3.55*	28.29 ± 3.76*	36.16 ± 4.51*
益肾化瘀方高剂量组	6	15.35 ± 2.88*▲▲	19.90 ± 2.93*▲▲	24.86 ± 3.89*▲▲
益肾化瘀方中剂量组	6	18.59 ± 1.91*▲▽	23.75 ± 2.86*▲▽	29.06 ± 2.94*▲▲▽
益肾化瘀方低剂量组	6	18.57 ± 3.29*▲▽	23.63 ± 4.02*▲▽	30.22 ± 2.89*▲▲▽
缬沙坦组	6	16.21 ± 2.83*▲▲	20.87 ± 2.41*▲▲	25.29 ± 2.44*▲▲

注：与同时间点假手术组比较，* $P < 0.01$ ；与同时间点模型组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ；与同时间点益肾化瘀方高剂量组比较，▽ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠不同时间肾组织 TGF- β 1 表达比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	28 d
假手术组	6	4.36 $\pm$ 2.69	4.82 $\pm$ 3.86	4.85 $\pm$ 3.02
模型组	6	23.72 $\pm$ 6.21*	30.80 $\pm$ 4.45*	33.69 $\pm$ 4.36*
益肾化瘀方高剂量组	6	18.01 $\pm$ 3.04* $\blacktriangle$	21.40 $\pm$ 3.25* $\blacktriangle$	25.33 $\pm$ 4.37* $\blacktriangle$
益肾化瘀方中剂量组	6	18.66 $\pm$ 3.78* $\blacktriangle$	26.13 $\pm$ 3.72* $\blacktriangledown$	28.59 $\pm$ 2.22* $\blacktriangle$
益肾化瘀方低剂量组	6	22.82 $\pm$ 3.25* $\blacktriangledown$	25.95 $\pm$ 3.55* $\blacktriangledown$	29.65 $\pm$ 2.70* $\blacktriangledown$
缬沙坦组	6	18.21 $\pm$ 3.34* $\blacktriangle$	21.06 $\pm$ 3.20* $\blacktriangle$	24.66 $\pm$ 3.51* $\blacktriangle$

注: 与同时点假手术组比较, * $P < 0.01$; 与同时点模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与同时点益肾化瘀方高剂量组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$

表 3 各组大鼠不同时间肾组织 Smad7 表达比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	28 d
假手术组	6	35.31 $\pm$ 4.49	34.29 $\pm$ 5.18	32.98 $\pm$ 4.44
模型组	6	20.50 $\pm$ 1.48*	14.74 $\pm$ 2.96*	9.10 $\pm$ 1.77*
益肾化瘀方高剂量组	6	28.41 $\pm$ 3.61* $\blacktriangle$	24.93 $\pm$ 4.23* $\blacktriangle$	20.62 $\pm$ 4.53* $\blacktriangle$
益肾化瘀方中剂量组	6	24.95 $\pm$ 3.01* $\blacktriangle$	19.87 $\pm$ 2.66* $\blacktriangledown$	14.71 $\pm$ 5.36* $\blacktriangledown$
益肾化瘀方低剂量组	6	24.30 $\pm$ 2.87* $\blacktriangledown$	19.73 $\pm$ 3.02* $\blacktriangledown$	14.90 $\pm$ 3.64* $\blacktriangledown$
缬沙坦组	6	29.30 $\pm$ 2.61* $\blacktriangle$	23.14 $\pm$ 4.93* $\blacktriangle$	21.45 $\pm$ 6.76* $\blacktriangle$

注: 与同时点假手术组比较, * $P < 0.01$; 与同时点模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与同时点益肾化瘀方高剂量组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$

3 讨论

TGF- β 1 作为公认的最重要的促纤维化因子之一,参与了肾间质纤维化的各个环节,其生物学效应需通过下游底物的介导来实现。Smads 蛋白是 TGF- β 1 信号转导过程中最重要的胞内效应因子,它能将 TGF- β 1 信号由胞膜转入核内。其中 Smad7 是细胞内 I 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白,能与活化的 TGF- β 1 型受体牢固结合,阻止 R-Smads 的磷酸化,从而形成一个负反馈环路,自动反馈调节 TGF- β 对靶基因的转录^[9]。因此作为 TGF- β 1/Smad 信号转导途径中关键的负调节蛋白,Smad7 被抑制是肾间质纤维化发生的重要原因。TGF- β 1 信号转导级联成为当前研究肾纤维化的潜在靶点,有效切断 TGF- β 1 的信号转导是终止和减轻肾纤维化的关键治疗措施之一^[6-7]。

中医学认为肾间质纤维化的主要病机为正虚邪实、本虚标实,且以肾虚为本,此已为众多医家所共识^[8]。益肾化瘀方中黄芪补气益肾,《本草经疏》称菟丝子为“补脾肾肝三经要药”,与黄芪同伍为君而达益气补肾之大功。丹参与莪术同伍既有化瘀逐瘀之功,又可缓莪术之峻猛之性,共达逐瘀通络、软坚消积、养血畅气之用。熟大黄为佐使药,制后缓其泻下之性,而活血化瘀和泻火解毒之功增强,而达缓泻润肠、活血逐瘀、排毒泻浊之功。全方共奏益气补肾、活血化瘀、泄浊排毒之功。本研究结果显示,益肾化瘀方能够减轻肾组织

病理损伤,减少肾间质纤维化面积,可以抑制大鼠肾组织中 TGF- β 1 的高表达,上调 Smad7 表达的活性,推测益肾化瘀方拮抗肾间质纤维化的机制可能是通过调控 TGF- β 1 信号向细胞核内的转导途径,起到一定的延缓肾间质纤维化进程作用,这可能是益肾化瘀方肾保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] Strupler M, Hernest M, Fligny C, et al. Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling [J]. J Biomed Opt, 2008, 13(5): 54-41.
- [2] 张佩青, 刘娜, 王丽彦. BMP-7/Smads/TGF- β 1 信号转导通路及肾间质纤维化 [J]. 医学综述, 2008, 14(1): 13-15.
- [3] 张琳琪, 高志卿, 李伟明. 益肾化瘀方对肾间质纤维化大鼠肾组织中 CTGF 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(11): 1500-1502.
- [4] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(5): 861-875.
- [5] 陈丽, 刘晓城. 高糖刺激下大鼠肾脏系膜细胞 Smad7 的表达及姜黄素对其表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(11): 634-636.
- [6] Mauviel A. Transforming growth factor - beta: a key mediator of fibrosis [J]. Methods Mol Med, 2005, 117: 69-80.
- [7] 董凤芹, 蔡伟民, 李红. 肾纤维化发病机制的研究进展 [J]. 国外医学泌尿系统分册, 2003, 23(4): 457-459.
- [8] 沈烨渠, 何立群. 补肾益气法防治肾间质纤维化机制研究概况 [J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 468-470.

Effects of *Yishen Huayu Formula* on the Expressions of TGF- β 1 and Smad7 in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction

ZHANG Linqi¹, ZHAO Yongqin², LIU Ruiyong³

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Henan Province 450000; 2. The People's Hospital of Changyuan County, Henan Province; 3. Zhengzhou People's Hospital)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Yishen Huayu Formula* (formula to supplement the kidney and transform stasis) for renal interstitial fibrosis. **Methods** Totally 108 Sprague Dawley rats were randomized into the sham operation group, model group, valsartan group and *Yishen Huayu Formula* high-dose, middle-dose and low-dose groups, with 18 in each. The models of renal interstitial fibrosis were established by unilateral ureteral obstruction in all groups except the sham operation group. On the 2nd day after modeling, *Yishen Huayu Formula* high-dose, middle-dose and low-dose groups were gavaged with 32 g/kg · d, 16 g/kg · d and 8 g/kg · d of *Yishen Huayu Formula* concentrated solution respectively, valsartan group was gavaged with 13.3 mg/kg · d of valsartan solution and sham operation group and model group were gavaged with 20 ml/kg · d of normal saline for 28 days. The pathological changes in kidney tissue were observed on the 7th, 14th, and 28th day after modeling. The renal interstitial fibrosis area was calculated. The expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and Smad7 signaling proteins were detected. **Results** There were renal interstitial infiltration of inflammatory cells, spindle nucleated cell proliferation and focal renal interstitial fibrosis in the model group. The pathological manifestations were reduced in all medication groups. The pathological changes in *Yishen Huayu Formula* high-dose group were the same as in valsartan group. Comparing with the sham operation group, the renal interstitial fibrosis areas and TGF- β 1 levels were significantly increased and the Smad7 levels were significantly decreased in other groups ($P < 0.01$). Comparing with the model group at the same time point, the renal interstitial fibrosis areas and TGF- β 1 levels were significantly decreased and the Smad7 levels were significantly increased in all medication groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in *Yishen Huayu Formula* high-dose group and valsartan group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yishen Huayu Formula* can reduce renal interstitial fibrosis possibly by inhibiting the expression of TGF- β 1 and up-regulating the expression of Smad7.

Keywords *Yishen Huayu Formula*; unilateral ureteral obstruction; renal interstitial fibrosis; transforming growth factor- β 1; Smad7 signaling proteins

(收稿日期: 2014-02-11; 修回日期: 2014-05-22)

[编辑: 洪涛]

中医杂志社医海林音像书店邮购图书目录

- | | | | |
|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| ●国医大师临床丛书 | 呼吸疾病 24 | 伤寒论临床精要 59 | 临床常见疾病影像诊断及治疗原则 128 |
| 李济仁医论医选集 98 | 骨伤病 24 | 伤寒论临床运用 59 | 糖络杂病论 (第2版) 128 |
| 中医古籍文献学 (第2版) 228 | 神经精神疾病 24 | 内经临床精要 59 | 伤寒论方剂当代研究 128 |
| 张琪学术思想探赜 78 | 儿科疾病 25 | 伤寒论临床发挥 68 | 柴浩然医论医案集 128 |
| ●名老中医方药心得丛书 | 老年疾病 25 | 内经临床运用 79 | 林沛湘学术经验集 138 |
| 祁宝玉眼科方药心得 50 | 风湿免疫及内分泌疾病 28 | ●其它图书 | 康复评定学 148 |
| 晁恩祥临证方药心得 58 | 社区常见疾病预防与保健 29 | 抗微生物药物合理应用手册 39 | 现代脉诊学 148 |
| 俞长荣临床经验集 68 | 社区急症 29 | 让“胰岛”动起来——我是这样战胜 | 岭南本草集锦 148 |
| 姜良铎内科方药心得 68 | 流行病与传染病 29 | 糖尿病的 (第3版) 39 | 章次公医案集 (增补版) 158 |
| 段富津方剂学讲课实录 78 | 社区医学检查诊断技术 29.8 | 中药药对表解 (修订版) 39 | 中药血清药物化学 188 |
| 周文泉老年病临证经验集 79 | 肾脏及血液疾病 29.9 | 手法治疗骨科软组织损伤图释 39.8 | 天然产物化学研究 198 |
| 徐福松男科纲目 88 | 耳鼻咽喉及口腔疾病 29.9 | 章次公《药理学》点校 48 | 广西特色中草药资源选编 498 |
| 白兆之临证经验集萃 88 | 泌尿生殖疾病 30 | 病毒学感染性疾病中医治疗学概要 54 | 千金翼方论译 110 |
| ●名医讲学荟萃 | 外科疾病 30 | 全国名老中医柴瑞霭临床经验集萃 78 | 当代中医外治精要 48 |
| 裘沛然讲《内经》 38 | 眼科疾病 35 | 病毒性传染病中医治疗概要 58 | 济阴济阳纲目 140 |
| 张琪讲临床 42 | 消化疾病 35 | 黄德彰医文精华 68 | 医学入门 68 |
| 孟庆云讲中医经典 58 | 社区护理 35 | 陈雨苍中医妇科临床经验 68 | 奇效良方 77 |
| ●农村卫生适宜技术推广丛书 | ●中医药科学方法学研究系列丛书 | 中医学概论 (英文版) 68 | 中医百年百名中医临床家丛书 340 |
| 地方性疾病中西医诊疗技术 27 | 中医临证特效实例与方法学思考 50 | 中医学导论 69.8 | 张氏医通 49 |
| 中药炮制实用技术 29.8 | 中医科学方法特征与沿革 69 | 常见肿瘤的非手术治疗 79 | 简明实用中医学 63 |
| 农村实用针灸技术 34 | 当代中医药学家谈科学思维与方法 88 | 张灿理医论医案精要 79 | 以上书均免费邮寄,欲购者请 |
| 农村实用液体疗法 37 | 古代中医药名家学术思想与认识论 98 | 中医药学名词内科学妇科学儿科学 88 | 汇款至北京东直门内北新仓 18 号 |
| 灾害医学救治技术 39.8 | 中医理论技术发展的方法学思考 118 | 脊髓损伤的中西医结合康复治疗 98 | 中医杂志社医海林音像书店图书 |
| ●社区医师中医诊疗规范丛书 | 中医临床基础医学研究 128 | 中国的藏医 (汉文、藏文、英文) 98 | 部收, 邮政编码: 100700. 电话: |
| 心血管病 22 | ●重读中医经典丛书 | 现代中成药的药材炮制 98 | (010) 64035632. 请在汇款单附言 |
| 社区康复 22 | 金匱要略临床运用 48 | 刘炳凡医论医案 118 | 栏写清所购书名、册数及邮编。 |
| 肿瘤 24 | 金匱要略临床精要 58 | 华廷芳学术经验集 128 | |