

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.20.016

复肾功方对慢性肾功能衰竭大鼠肾功能及 Shh 信号通路的影响

万磊, 黄学宽*, 王玲, 杨玉

(重庆医科大学中医药学院, 重庆市渝中区医学院路 1 号, 400016)

摘要 目的 观察复肾功方治疗慢性肾功能衰竭的可能作用机制。方法 将 55 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组及复肾功方低、中、高剂量组, 每组 11 只。正常组自由饮食, 其余 4 组大鼠食用含 0.5% 腺嘌呤饲料制造慢性肾功能衰竭模型。造模后正常组和模型组给予生理盐水 20 ml/kg 灌胃; 复肾功方低、中、高剂量组分别以 4、8、16 g/kg 灌胃复肾功方, 每日 1 次, 连续 30 天。检测各组大鼠血肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 水平, HE 染色检测肾组织形态学改变, 免疫组化检测音猬因子 (Shh)、神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (Gli1) 的表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠 SCr 和 BUN 水平及肾组织 Shh、Gli1 水平明显升高 ($P < 0.05$), 肾间质出现明显纤维化病变。复肾功方各剂量组大鼠 SCr 和 BUN 水平及肾组织 Shh、Gli1 水平较模型组均明显降低, 其中复肾功方高剂量组各指标水平最低, 3 组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 复肾功方能明显改善慢性肾功能衰竭大鼠肾功能, 且随剂量增加改善效果更好, 其机制可能与抑制 Shh 信号通路的激活有关。

关键词 慢性肾功能衰竭; 复肾功方; 肾功能; Shh 信号通路

慢性肾功能衰竭 (chronic renal failure, CRF) 是由慢性进行性肾实质损害而导致肾脏功能受损的临床综合征^[1]。肾间质纤维化是慢性肾脏疾病进行性发展的共同通路, 是导致 CRF 的主要病理基础^[2]。而肾间质纤维化发生机制可能与音猬因子 (Sonic hedgehog, Shh) 信号通路分子被激活有关^[3]。复肾功方是首届国医大师郭子光教授的经验方, 主要用于慢性肾功能不全 I、II 期 (代偿期、失代偿期) 的非替代疗法, 可逆转肾功能, 尤其对高血压肾损害和糖尿病肾病疗效突出^[4]。本实验探讨复肾功方对 CRF 大鼠肾功能的及 Shh 信号通路的影响, 旨在研究复肾功方治疗 CRF 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 55 只, 体重 (200 ± 20) g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (渝) 2012-0001。

基金项目: 重庆市自然科学基金 (cstc2011jjA10058); 重庆市九龙坡区社会事业类科技项目 (九龙坡科委发 [2011] 62 号, 九龙坡科委发 [2013] 37 号)

* 通讯作者: xkhuang2002@163.com, 13452382058

1.2 药品与试剂

复肾功方由黄芪、水蛭、车前子、牛膝、牡丹皮、泽泻、茯苓、山萸肉、山药、生地黄、杜仲、黄柏、苍术等组成, 配伍比例为 5 : 1 : 1.5 : 1.5 : 1.5 : 1 : 2 : 1.5 : 2 : 1.5 : 1.5 : 1.5 : 1.5, 原药购自重庆西部医药商城有限责任公司, 由重庆医科大学中医药学院鉴定, 按常规方法制备成浓度为 1.0 g/ml 的水煎剂。腺嘌呤 (货号 A0205) 由西安国安生物科技有限公司 (Sigma-Aldrich 分装) 提供; 兔抗大鼠生物素化 IgG 二抗试剂盒 (批号 14188A01) 及二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (批号 14164A01) 由北京中杉金桥生物技术有限公司提供; Shh 一抗 (批号 D-B1-07G07A) 由武汉博士德生物工程有限公司提供, 神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1 (Gli1) 一抗 (批号 G4315) 由美国 Santa Cruz Biotechnology 公司提供; 抗原修复液 (批号 bh20140501) 由河北博海生物工程开发有限公司提供。

1.3 仪器

AU400 全自动生化分析仪, 日本 Olympus 公司; BX51T-PHD-J11 型显微镜, 日本 Olympus 公司; 80-2 型低速离心机, 上海手术器械厂; CMOS

图像采集系统, 日本 Olympus 公司; Image-Pro Plus 5.0 软件, 美国 Media Cybernetics 公司; RM2015 型切片机, 德国莱卡公司。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药方法

55 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 根据随机数字表法将大鼠分为正常组、模型组及复肾功方低、中、高剂量组, 每组 11 只。正常组常规饲养, 其余大鼠参照文献 [5] 建立 CRF 模型, 食用含 0.5% 腺嘌呤饲料, 用代谢笼喂养大鼠, 每笼 1 只, 每只大鼠按 1 天食入 20 g 料块计算, 连续 21 天。造模后各组用随机数字表法抽取 1 只大鼠, 眼球采血, 分离血清检测血肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 水平, 处死大鼠, 取出肾脏, 石蜡包埋切片, HE 染色检测肾组织形态学改变。以 BUN 和 SCr 含量显著升高, 肾小球变形萎缩, 肾小管萎缩, 管腔明显扩大, 肾间质明显纤维化, 肾间质炎性细胞弥漫浸润为造模成功。造模成功后所有大鼠均停用含 0.5% 腺嘌呤的饲料, 改用常规饲料。

从造模成功后第 1 天起, 正常组和模型组给予生理盐水 20 ml/kg 灌胃, 复肾功方低、中、高剂量组分别以 4、8、16 g/kg 灌胃复肾功方水煎剂, 每日 1 次, 连续 30 天。

2.2 指标检测及方法

2.2.1 一般情况 实验过程中观察各组大鼠精神状态、体重、体毛、饲料量、大小便及活动情况。

2.2.2 血清 SCr、BUN 含量检测 治疗 30 天, 末次给药后禁食不禁水 12 h, 按 20% 乌拉坦 5 ml/kg 进行麻醉, 摘取眼球采血 3 ~ 5 ml, 静置 1 ~ 2 h, 4000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 取上清液, 用全自动生化分析仪检测。

2.2.3 病理组织学观察 颈椎脱臼处死大鼠, 打开腹腔取出肾脏, 取左侧组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇和苏木精-伊红 (HE) 染色, 常规脱水、透明、中性树脂封片、镜检。

2.2.4 免疫组织化学法检测 Shh、Gli1 蛋白表达 摘取右侧肾脏, 取 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.1 cm 组织块, 4% 多聚甲醛固定, 经梯度乙醇、二甲苯透明、55℃ 石蜡包埋后切片, 厚度 4 μ m, 采用 SP 法染色。切片常规脱蜡水化, 滴加抗原修复液进行抗原修复, 一抗按 1 : 100 稀释, 4℃ 孵育过夜。DAB 显色后经苏木素复染, 1% 盐酸酒精分化, 1% 氨水反蓝, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封

片、镜检。细胞质内或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性表达, 用 Image-Pro Plus 5.0 软件分析各组免疫组化切片的阳性灰度平均值。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况

模型组大鼠活力下降、精神萎靡、食量减少、肢体浮肿、脱毛, 体重略有减轻。复肾功方低剂量组大鼠活动相对增多, 食量、体重有所增加, 脱毛现象轻度改善, 肢体浮肿未见明显改善; 复肾功方中剂量组大鼠活动量、食量、体重明显增加, 脱毛现象明显改善, 肢体浮肿有所减轻; 复肾功方高剂量组大鼠活动明显增多, 饮食、体重、脱毛、肢体浮肿等明显改善。

3.2 各组大鼠血清 SCr 和 BUN 含量比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组及复肾功方低、中、高剂量组大鼠 SCr 和 BUN 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复肾功方各剂量组大鼠 SCr 和 BUN 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 其中复肾功方高剂量组 SCr 和 BUN 水平最低, 3 组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 SCr、BUN 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SCr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)
正常组	10	33.79 $\pm$ 2.45	5.92 $\pm$ 3.12
模型组	10	238.77 $\pm$ 4.72*	29.27 $\pm$ 8.30*
复肾功方低剂量组	10	131.95 $\pm$ 6.09* Δ	12.65 $\pm$ 1.73* Δ
复肾功方中剂量组	10	127.05 $\pm$ 7.90* Δ Δ	10.24 $\pm$ 1.45* Δ Δ
复肾功方高剂量组	10	119.36 $\pm$ 5.24* Δ Δ $\#$	9.55 $\pm$ 1.03* Δ Δ $\#$

注: SCr, 血清肌酐; BUN, 尿素氮; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与复肾功方低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与复肾功方中剂量组比较, $\#P < 0.05$

3.3 各组大鼠肾脏组织形态学变化

正常组大鼠肾脏呈红褐色、质软、无肿胀, 而模型组大鼠肾脏外观苍白、肿胀, 复肾功方低、中、高剂量组大鼠肾脏外观苍白、肿胀明显减轻, 以高剂量组肾脏外观的改善最为明显。图 1 示, 正常组大鼠肾小管和肾小球结构正常, 未见明显组织学改变; 模型组大鼠肾小球变形萎缩, 球囊闭塞, 新月体形成, 肾小管萎缩, 管腔明显扩大, 间质纤维化明显, 间质炎性细胞弥漫浸润; 复肾功方低剂量组大鼠肾小球、肾小管萎缩及间质纤维化有所减轻, 间质炎性细胞弥漫浸润; 复肾功方中剂量组大

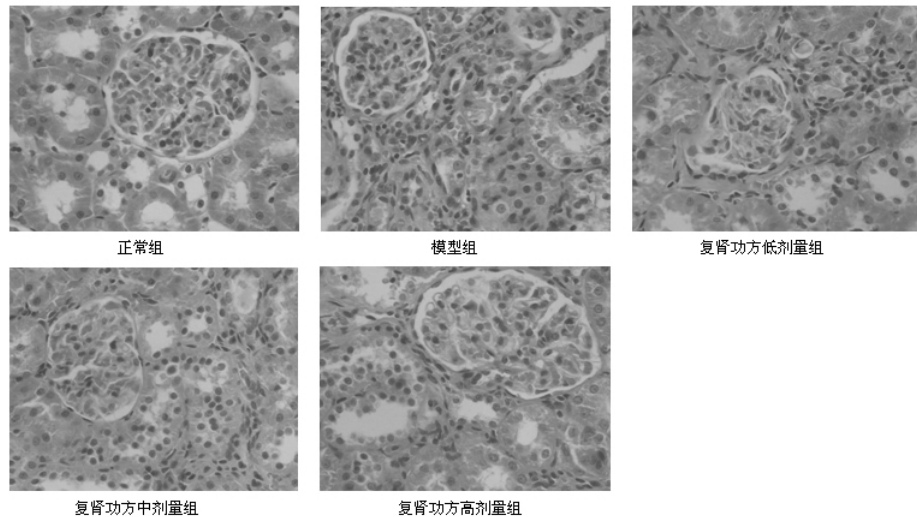


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色结果 (×400)

鼠肾小球、肾小管萎缩及间质纤维化减轻较明显, 间质炎性细胞浸润减轻; 复肾功方高剂量组大鼠肾小球、肾小管萎缩及间质纤维化显著减轻, 间质炎性细胞浸润明显减轻。

3.4 各组大鼠肾组织 Shh、Gli1 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组及复肾功方各剂量组大鼠肾组织 Shh 和 Gli1 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复肾功方各剂量组肾组织 Shh 和 Gli1 水平均明显下降 ($P < 0.05$), 其中复肾功方高剂量组肾组织 Shh 和 Gli1 水平最低, 3 组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾组织 Shh 和 Gli1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Shh	Gli1
正常组	10	20.71 ± 1.24	21.39 ± 1.12
模型组	10	162.16 ± 14.29*	156.11 ± 15.77*
复肾功方低剂量组	10	136.24 ± 11.87*△	142.24 ± 12.47*△
复肾功方中剂量组	10	97.20 ± 9.11*△▲	114.42 ± 7.18*△▲
复肾功方高剂量组	10	36.13 ± 3.81*△▲#	72.46 ± 7.60*△▲#

注: Shh, 音猬因子; Gli1, 神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与复肾功方低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; 与复肾功方中剂量组比较, # $P < 0.05$

4 讨论

Shh 通路是一条进化保守的信号通路, 与人类胚胎发育过程中细胞增殖和组织分化的调控密切相关。在哺乳动物中, Shh 通路主要由豪猪蛋白配体中的 Shh、2 个跨膜蛋白受体 Patched (Ptc) 、Smoothered (Smo) 及下游的核转录因子 Gli 组成^[1]。当 Shh 信号通路被激活时, Shh 配体与靶细胞膜受体 Ptc 结合, 解除 Ptc 对跨膜蛋白受体 Smo 的抑制, 进而激活下游的核转录因子 Gli 家

族, 诱导目的基因表达, 从而调控细胞生长增殖和分化^[1]。Shh 蛋白以浓度梯度的方式在局部或远距离诱导多种组织细胞的分化^[2-3]。有研究显示, Shh 信号的异常活化与胆管、肝脏纤维化过程有关^[4-11]。Gli 是一种锌指核转录因子, 可作为 Shh 信号通路激活的标记基因^[12]。在哺乳动物中, Gli 包括 3 种核转录因子, 即 Gli1、Gli2、Gli3, 而肾上皮细胞中 Gli1 的过度表达会促进 Snail 的表达上调, 从而促进肾小管上皮细胞-间充质转化的发生^[13], 而肾小管上皮细胞-间充质转化是肾间质纤维化的重要机制^[14]。

CRF 属中医学“关格”“肾劳”“癃闭”“水肿”“溺毒”等范畴。郭子光教授认为, CRF 基本病机为气血失调、痰瘀阻络, 其中 CRF 早中期以肺肾虚损 (兼湿浊瘀阻) 为主要病机, 晚期则以肺脾肾虚极, 兼湿浊困阻、心肝火旺为主要病机, 而病至终末期, 五脏交亏, 出入废, 升降息^[15]。复肾功方针对气血失调、痰瘀阻络、脏腑虚衰病机创立, 方中生地黄清热凉血、养阴生津, 山药补肺脾肾、益气固精, 山萸肉补益肝肾、收敛固涩, 杜仲、牛膝补肝肾、强筋骨, 诸药合用, 重在补益虚损。而黄柏清热燥湿, 泽泻清泻肾火、利湿泻浊, 以防生地黄滋腻; 茯苓淡渗水湿, 车前子渗湿止泻, 苍术燥湿健脾, 以助山药之健运; 牡丹皮清泄肝火, 可制山萸肉之温涩; 黄芪补气健脾、水蛭破血消癥, 可发挥补气活血、祛瘀生新之力。全方共奏调和气血、祛瘀化癥、补益脏腑正气之功。

本研究结果显示, 模型组大鼠出现活力下降、精神萎靡、进食量减少、肢体浮肿、脱毛、体重略有减轻等症状, 肾间质纤维化明显, SCr 和 BUN

水平及肾组织 Shh 和 Gli1 水平明显升高; 而复肾功方治疗后, 上述症状明显改善, 肾间质纤维化减轻, 肾组织 Shh 和 Gli1 水平也有不同程度降低, 其中以复肾功方高剂量组的病理改变减轻最为明显, 提示复肾功方能明显改善 CRF 大鼠肾功能, 且随剂量增加改善效果更好, 其机制可能与抑制 CRF 过程中 Shh 信号通路的激活有关。

参考文献

- [1] 王宝安, 吴金玉, 龙韵, 等. 慢性肾衰竭的中医药治疗进展 [J]. 中医学报, 2011, 26(7): 854-855.
- [2] 周宝尚, 张璟. Wnt 信号通路及肾脏纤维化 [J]. 重庆医学, 2011, 40(28): 2894-2896.
- [3] 白永恒, 陆红, 周琴, 等. Sonic hedgehog 信号通路在单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中的表达变化及意义 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(12): 2227-2232.
- [4] 黄学宽. 郭子光临床经验集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 275.
- [5] 陈奇. 中药药效研究思路与方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 563-564.
- [6] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles [J]. Genes Dev, 2001, 15(23): 3059-3087.
- [7] Crompton T, Outram SV, Hager-Theodorides AL. Sonic hedgehog signaling in T-cell development and activation

[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(9): 726-735.

- [8] Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human Hematopoietic cells via BMP regulation [J]. Nat Immunol, 2001, 2(2): 172-180.
- [9] Calloni GW, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, et al. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(50): 19879-19884.
- [10] Omenetti A, Porrello A, Jung Y, et al. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans [J]. J Clin Invest, 2008, 118(10): 3331-3342.
- [11] 刘琨, 徐选福, 王兴鹏, 等. Hedgehog 通路及肝纤维化及肝星状细胞活化的关系研究 [J]. 中华消化外科杂志, 2009, 29(2): 101-104.
- [12] Osterlund T, Kogerman P. Hedgehog signaling: how to get from Smo to Ci and Gli [J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(4): 176-180.
- [13] 林智平, 熊小亮. Gli1 的表达及与上皮-间质转化的关系 [J]. 江西医药, 2012, 47(4): 367-369.
- [14] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. Pediatr Nephrol, 2000, 15(3/4): 290-301.
- [15] 刘渊, 郭子光. 郭子光从肺肾虚损辨治早中期慢性肾衰竭经验 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(90): 4-5.

The Effects of *Fushengong Formula* (复肾功方) on Renal Function and Shh Signal Pathway of Rats with Chronic Renal Failure

WAN Lei, HUANG Xuekuan, WANG Ling, YANG Yu

(Chinese Medicine School, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016)

ABSTRACT Objective To observe the possible function mechanism of *Fushengong Formula* in treating chronic renal failure. **Methods** Fifty-five Sprague Dawley rats were randomly divided into normal group, model group and low, middle and high *Fushengong Formula* groups, with 11 rats in each. Normal group ate freely. Other 4 groups of rats were fed with fodder containing 0.5% adenine to make chronic renal failure model. The normal and model groups were orally gavaged with normal saline 20 ml/kg after modeling; while the low, middle and high *Fushengong Formula* groups were orally gavaged with 4, 8, or 16 g/kg of *Fushengong Formula* respectively, once per day, for 30 days. Serum levels of creatinine (SCr) and urea nitrogen (BUN) of rats in each group were tested. Kidney tissue morphology change was observed through HE dyeing. Expression levels of sonic hedgehog (Shh) and glioma related cancer gene homologous proteins 1 (Gli1) were tested immunohistochemically. **Results** Serum levels of SCr and BUN and expression levels of Shh and Gli1 in renal interstitium of rats increased remarkably ($P < 0.05$), and there appeared obvious fibrotic lesions in renal interstitium in model group compared with those in normal group. Serum levels of SCr and BUN and expression levels of Shh and Gli1 of rats in each dose of *Fushengong Formula* group decreased remarkably compared with that in model group ($P < 0.05$), especially in high-dose *Fushengong Formula* group. There was statistically significant differences in those indexes between each two *Fushengong Formula* groups ($P < 0.05$). **Conclusion** *Fushengong Formula* could remarkably improve renal function of rats with chronic renal failure. And the improving effects were better when dose increased. Its possible mechanism may have a relationship with inhibiting activating Shh signal pathway.

Keywords chronic renal failure; *Fushengong Formula*; renal function; Shh signal pathway

(收稿日期: 2014-12-20; 修回日期: 2015-03-06)

编辑: 王利芬