

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.09.017

排毒保肾丸对肾纤维化大鼠肾组织 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响

王水华*, 陈帮明, 刘永芳, 车卫平, 吴兆东, 王国斌, 夏晓勤, 黄红恩, 魏林, 钟利平

(九江市中医医院, 江西省九江市庐山区德化路 555 号, 332000)

摘要 目的 观察排毒保肾丸对 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的影响并探讨其可能作用机制。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、排毒保肾丸组、尿毒清颗粒组, 每组 10 只。除正常组、假手术组外, 其余各组大鼠均采用 5/6 肾切除方法建立肾纤维化模型。排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组分别予排毒保肾丸 1.0 g/(kg·d) 和尿毒清颗粒 3.33 g/(kg·d) 灌胃, 正常组、假手术组、模型组予 2 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次。各组均灌胃 4 周后处死大鼠, 取残肾组织行 HE、PAS、PASM、Masson 染色病理观察, 检测肾组织转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、Smad2、Smad7 蛋白及其 mRNA 的表达水平。结果 病理结果显示, 模型组大鼠局灶节段性肾小球缺血性皱缩, 较多炎性细胞浸润伴轻至中度纤维化; 与模型组比较, 排毒保肾丸组残肾组织病变程度减轻。与正常组、假手术组比较, 模型组大鼠 TGF- β 1 蛋白及其 mRNA、Smad2 蛋白及其 mRNA 表达水平均显著升高, Smad7 蛋白及其 mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组 TGF- β 1 蛋白及其 mRNA、Smad2 蛋白及其 mRNA 表达水平均显著降低, 而 Smad7 蛋白及其 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。结论 排毒保肾丸有抗肾纤维化的作用, 下调肾组织 TGF- β 1、Smad2 的表达和上调 Smad7 的表达可能是其作用机制之一。

关键词 肾纤维化; 排毒保肾丸; 大黄廑虫丸; 转化生长因子 β 1; Smad 蛋白

肾纤维化是所有慢性肾脏病进展至终末期的共同通路^[1]。如何阻断或延缓肾纤维化的进展是国内外肾脏病研究的热点和难点。排毒保肾丸是九江市中医医院根据慢性肾功能衰竭“以虚为本, 常兼瘀血”的病机特点在大黄廑虫丸基础上化裁研制而成, 在我院肾病临床已使用 10 余年, 具有较好的延缓肾功能衰竭进展的作用^[2]。本实验观察了排毒保肾丸对 5/6 肾切除大鼠肾组织病理及 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响, 探讨其抗肾纤维化的疗效及可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 50 只, SPF 级, 体重 (160 $\pm$ 10) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。

1.2 药物

排毒保肾丸组成: 熟大黄 300 g, 生地黄

300 g, 桃仁 60 g, 煅干漆 30 g, 炒廑虫 30 g, 炒蛭 60 g, 炒水蛭 60 g, 黄芩 60 g, 赤芍 60 g, 苦杏仁 60 g, 甘草 90 g, 由江西省九江市中医医院制剂室提供, 6 g/袋, 批号: 20130501。尿毒清颗粒 (无糖型) 由康臣药业 (内蒙古) 有限责任公司生产, 5 g/袋, 批号: 20130122。

1.3 主要仪器

KD-TS3A 自动组织脱水机、KD-BM 生物组织冷冻包埋机、KD-P 摊片机、KD-H 烘片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司), HM325 轮转切片机 (德国 Microm International GmbH 公司), CX41-72C02 光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 80I 荧光显微镜 + 数码成像系统 (日本 Nikon 公司), F6/10 手握式电动匀浆机 (德国 FLUKO 公司), 3K15 低温冷冻离心机 (德国 Sigma 公司), ABI-7300 Real-time 检测仪 (美国 ABI 公司)。

1.4 试剂

转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 单克隆抗体 (批号: BA0290)、Smad2 单克隆抗体 (批号:

基金项目: 江西省科技计划 (20111BBG70008-1)

* 通讯作者: jjzyysbk@163.com, (0792) 8188306

BA4557)、Smad7 单克隆抗体(批号: BA1399)、SABC 法免疫组化试剂盒(批号: SA1022)均购自武汉博士德生物工程有限公司; Trizol 提取试剂盒(批号: 15596-026, Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒(批号: #K1622, Thermo 公司); SYBRGreen PCR 试剂盒(批号: F-415XL, Thermo 公司); HE 染色试剂盒(批号: 201306-A20)、PAS 染色试剂盒(批号: 201306-C15)、PASM 染色试剂盒(批号: 201306-E08)、Masson 染色试剂盒(批号: 201306-N12)均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.5 造模、分组和给药方法

50 只 SD 大鼠采用 SPSS16.0 产生的随机号分为正常组、假手术组、模型组、排毒保肾丸组、尿毒清颗粒组, 每组 10 只。模型组、排毒保肾丸组、尿毒清颗粒组参照文献 [6] 采用 5/6 肾切除方法建立肾纤维化模型, 假手术组手术只分离肾包膜不行肾切除。术后排毒保肾丸组给予排毒保肾丸 1.0 g/(kg·d), 尿毒清颗粒组给予尿毒清颗粒 3.33 g/(kg·d), 药物加入 2 ml 生理盐水中灌胃, 每日 1 次。正常组、假手术组、模型组大鼠给予 2 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次。各组均灌胃 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 肾组织病理 灌胃结束后处死大鼠, 取出部分左侧肾脏, 去包膜, 10% 甲醛固定, 脱水、包埋, 2 μm 石蜡切片, 行 HE、PAS、PASM、Masson 染色, 显微镜下观察。

1.6.2 肾组织 TGF-β1、Smad2 和 Smad7 蛋白的定位和表达 采用 SABC 法, 一抗稀释浓度均为 1:100。步骤为: 石蜡切片脱蜡至水, 3% H₂O₂ 灭活, 微波热修复抗原, 自然冷却, 5% BSA 封闭, 37℃ 孵育一抗, 滴加二抗后室温孵育, 滴加 SABC 复合物室温孵育, DAB 显色, 苏木素复染, 分化, 脱水、透明、封片、镜检。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性染色为棕黄色。光学显微镜×400 摄取图像, 每个标本随机选取 10 个视野进行拍摄并计算其平均光密度即 IOD/area, 后求均值, 采用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像软件进行分析。

1.6.3 肾组织 TGF-β1、Smad2 和 Smad7 mRNA 表达 取大鼠新鲜肾脏, Trizol 提取总 RNA, 逆转录试剂盒逆转录 cDNA。TGF-β1、Smad2、Smad7 引物设计由上海基尔顿生物科技有限公司合成。TGF-β1 引物为: 5'-AAGGACCTGGGTGGAAGTGC3' (F); 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC3' (R), 125bp。Smad2 引物为: 5'-TCCATCTTGCCATTCAC3' (F);

5'-TCCTGTCCATTCTGTTCTC3' (R), 104bp。Smad7 引物为: 5'-ATACTGGGAGGAGAAGAC3' (F), 5'-CGGACTTGATGAAGATGG3' (R), 239bp。GAPDH 引物为: 5'-GTCGGTGTGAACGGATTG3' (F); 5'-TCCCATTCTCAGCCTTGAC3' (R), 181bp。总反应体系为 20 μl。扩增条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 15s, 60℃ 退火 45s, 40 个循环。溶解曲线: 95℃ 15s→60℃ 1 min→95℃ 15s→60℃ 15s。采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析数据。

1.7 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织病理变化比较

排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组因灌胃原因各死亡大鼠 1 只。肾组织 HE、PAS、PASM 及 Masson 染色显示, 正常组和假手术组大鼠肾组织无明显异常病理改变; 模型组大鼠残肾代偿性肥大, 与周围组织无粘连, 肾小球轻度增大, 系膜细胞及基质中至重度增生伴局灶节段性肾小球硬化, 局灶节段性肾小球缺血性皱缩, 肾小管空泡变性, 蛋白管型多见, 灶性小管萎缩, 间质增宽, 较多炎性细胞浸润伴轻至中度纤维化, 肾小动脉管壁增厚; 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组大鼠残肾肾皮质肾小球数量减少, 肾小球轻度增大, 局灶性轻度系膜细胞及基质增生, 小管腔内偶见蛋白管型, 间质少量炎性细胞浸润, 肾小动脉管壁无增厚, 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组大鼠肾组织病变轻于模型组。

2.2 各组大鼠肾组织 TGF-β1、Smad2 和 Smad7 蛋白表达比较

表 1 示, 与正常组、假手术组比较, 模型组大鼠 TGF-β1、Smad2 蛋白表达水平均显著升高, Smad7 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组 TGF-

表 1 各组大鼠肾组织 TGF-β1、Smad2 和 Smad7 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF-β1 蛋白	Smad2 蛋白	Smad7 蛋白
正常组	10	0.100 ± 0.032*	0.183 ± 0.046*	0.083 ± 0.022*
假手术组	10	0.105 ± 0.028*	0.177 ± 0.054*	0.081 ± 0.028*
模型组	10	0.405 ± 0.108	0.605 ± 0.181	0.017 ± 0.005
排毒保肾丸组	9	0.142 ± 0.063*	0.305 ± 0.084*	0.073 ± 0.020*
尿毒清颗粒组	9	0.131 ± 0.048*	0.234 ± 0.075*	0.058 ± 0.013*

注: TGF-β1, 转化生长因子 β1; 与模型组比较, * $P < 0.01$

$\beta 1$ 、Smad2 蛋白表达水平均显著降低, Smad7 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与尿毒清颗粒组比较, 排毒保肾丸组 TGF- $\beta 1$ 、Smad2 和 Smad7 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2 和 Smad7 mRNA 表达水平比较

表 2 示, 与正常组、假手术组比较, 模型组大鼠 TGF- $\beta 1$ 和 Smad2 mRNA 表达水平显著升高, Smad7 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组 TGF- $\beta 1$ 和 Smad2 mRNA 表达水平均显著降低, Smad7 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与尿毒清颗粒组比较, 排毒保肾丸组 TGF- $\beta 1$ 、Smad2 和 Smad7 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2 和 Smad7 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- $\beta 1$ mRNA	Smad2 mRNA	Smad7 mRNA
正常组	10	1.03 $\pm$ 0.15*	1.45 $\pm$ 0.74*	0.59 $\pm$ 0.31*
假手术组	10	1.01 $\pm$ 0.10*	1.42 $\pm$ 0.54*	0.58 $\pm$ 0.25*
模型组	10	5.28 $\pm$ 1.65	6.06 $\pm$ 1.59	0.09 $\pm$ 0.05
排毒保肾丸组	9	1.54 $\pm$ 0.51*	3.34 $\pm$ 1.87*	0.53 $\pm$ 0.17*
尿毒清颗粒组	9	1.21 $\pm$ 0.50*	2.47 $\pm$ 1.24*	0.36 $\pm$ 0.25*

注: TGF- $\beta 1$, 转化生长因子 $\beta 1$; 与模型组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

肾脏纤维化的发生机制非常复杂, 很多细胞介质和生长因子都直接或间接地参与了这一过程, 其中 TGF- $\beta 1$ 被认为是最主要的致纤维化因子^[4]。既往研究显示, TGF- $\beta 1$ 是肾纤维化的关键因素, Smad 蛋白是 TGF- β 家族信号从受体到核的细胞内转导分子, TGF- $\beta 1$ /Smad 信号转导通路在肾纤维化的发生发展中起重要作用, 是肾纤维化主要的共同通路^[5-8]。Lan 等^[9] 在大鼠单侧输尿管梗阻实验中发现, 肾纤维化受 Smad2、Smad3 正向调节和 Smad7 负向调节。因此, 有效阻断 TGF- $\beta 1$ 的信号转导, 是终止和减轻肾纤维化的关键^[9]。

排毒保肾丸以养血祛瘀泄浊立法, 在大黄廔虫丸基础上去虻虫组方, 方中熟大黄祛瘀排浊; 桃仁、干漆活血逐瘀; 水蛭、廔虫、蛭蟥通络消瘀, 增强破瘀之力; 生地黄滋补阴液, 合赤芍、甘草濡养血脉, 和中缓急而扶正; 黄芩清瘀热, 合杏仁开宣肺气、润心营以解郁热; 诸药配伍, 促进气血运行, 通畅血脉, 排泄湿浊及毒邪, 恢复脏腑功能, 使气血营卫协调, 全方具有“润以濡其干, 虫以

动其瘀, 通以去其闭”的特点。国内其他研究亦显示大黄廔虫丸具有抗大鼠肾纤维化的作用, 如华何与等^[8] 发现大黄廔虫丸超微粉剂能降低单侧输尿管结扎所致肾纤维化大鼠血肌酐、尿素氮、透明质酸、粘连蛋白、Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原; 魏连波等^[10] 研究显示大黄廔虫丸可明显减轻腺嘌呤所致肾间质纤维化大鼠纤维化程度, 下调 TGF- $\beta 1$ 蛋白及其 mRNA 的表达。本实验病理结果显示, 5/6 肾切除大鼠残肾代偿性肥大, 较多炎性细胞浸润伴轻至中度纤维化, 经给予排毒保肾丸治疗后肾组织病变程度减轻, 肾组织 TGF- $\beta 1$ 蛋白及其 mRNA、Smad2 蛋白及其 mRNA 表达均显著减少, Smad7 蛋白及其 mRNA 表达显著升高, 说明排毒保肾丸具有抗肾纤维化的作用, 其作用机制可能与下调肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2 的表达和上调 Smad7 的表达有关。

(致谢: 此实验在上海中医药大学附属曙光医院肾病研究所完成, 得到了何立群教授、黄迪副主任研究员的指导与支持, 特表示感谢!)

参考文献

- [1] 王海燕. 肾脏病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 799-815.
- [2] 王水华, 邓宏韬, 王国斌, 等. 排毒保肾丸治疗慢性肾功能衰竭的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(8): 735-738.
- [3] 陈香美. 肾脏病学实验技术操作规程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 199-200.
- [4] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics [J]. Kidney Int, 2006, 69(2): 213-217.
- [5] Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling [J]. FASEB J, 1999, 13(15): 2105-2124.
- [6] Schiffer M, Von Gersdorff G, Bitzer M, et al. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling [J]. Kidney Int Suppl, 2000, 58(77): 45-52.
- [7] Lan HY, Mu W, Tomita N, et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(6): 1535-1548.
- [8] Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis [J]. Methods Mol Med, 2005, 117(8): 69-80.
- [9] 华何与, 吕志平, 陈育尧, 等. 大黄廔虫丸超微粉剂对大鼠肾间质纤维化的影响 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(4): 387-389.
- [10] 魏连波, 马志刚, 吕瑞和, 等. 大黄廔虫丸对大鼠肾间质纤维化及 TGF- $\beta 1$ 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(6): 115-118.

Effect of *Paidu Baoshen Wan* (排毒保肾丸) on TGF- β 1/Smad Signal Pathway of Nephridial Tissue in Renal Fibrosis Rats

WANG Shuihua, CHEN Bangming, LIU Yongfang, CHE Weiping, WU Zhaodong, WANG Guobin, XIA Xiaoqin, HUANG Hong'en, WEI Lin, ZHONG Liping

(Chinese Medicine Hospital of Jiujiang City, Jiangxi 332000, China)

ABSTRACT Objective To observe effect of *Paidu Baoshen Wan* (PDBSW) on renal fibrosis of rats with 5/6 nephrectomy and to discuss the underlying mechanism. **Methods** Fifty SD rats were randomized into normal group, sham-operation group, model group, PDBSW group and *Niaoduling Granules* (尿毒清颗粒, NDQG) group, with 10 rats in each group. Excluding normal group and sham-operation group, the others received 5/6 nephrectomy to make renal fibrosis model. The PDBSW group and the NDQG group were respectively given PDBSW 1.0 g/ (kg · d) and NDQG 3.33 g/ (kg · d) by gavage, while the normal group, the sham-operation group and the model group were given normal saline 2 ml/d by gavage. Four weeks later, killed rats and collected remnant nephridial tissue to observe pathology stained by HE, PAS, PASM, Masson, and then to test expression level of protein and mRNA of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Smad2 and Smad7. **Results** In the model group, topo-segmental glomerulus ischemic atrophy occurred, with much inflammatory cell infiltration and mild to moderate fibrosis. Compared with the model group, the degree of remnant nephridial lesion decreased in PDBSW group. Compared with the normal group and the sham-operation group, expression levels of protein and mRNA of TGF- β 1, Smad2 increased markedly in the model group, while those of Smad7 decreased markedly ($P < 0.01$). Compared with the model group, expression levels of protein and mRNA of TGF- β 1, Smad2 in the PDBSW group and the NDQG group decreased markedly, while those of Smad7 increased markedly ($P < 0.01$). **Conclusion** PDBSW may help resist renal fibrosis. These effects may be due to reducing expression of TGF- β 1 and Smad2, meanwhile increasing expression of Smad7 in nephridial tissue.

Keywords renal fibrosis; *Paidu Baoshen Wan* (排毒保肾丸); *Dahuang Zhechong Wan* (大黄廔虫丸); transforming growth factor β 1; Smad protein

(收稿日期: 2014 - 06 - 18; 修回日期: 2014 - 11 - 27)

编辑: 邓 媛

读者 · 作者 · 编者

论文中表的应用

表格是学术论文中清晰、直观地表达结果的必要工具, 正确、合理、规范地使用表格, 有助于读者理解全文, 往往可以达到文字叙述难以达到的效果。图的运用应遵从如下规则。

1. 应具有自明性和可读性, 读者不必查找前后文内容即可理解表格中所表达的含义。
2. 应按正文中出现的顺序用阿拉伯数字依序编号, 表题连同表序置于表的上方。
3. 表中的内容不应与正文文字及插图内容重复。
4. 数据表宜采用国际通行的三线表格式, 力求结构简洁。
5. 表中的量、单位、符号、缩略语等应与正文中所写一致。出现缩略语宜在表注中注明中文名称。
6. 表内参数同一指标保留的小数位数应相同, 同一栏的数字应按位次上下对齐。
7. 统计表中应列出样本数, 表中的符号、标记、代码以及需要说明的事项以最简练的文字作为表注附于表的下方。
8. 中文期刊表题及表内其他文字说明可以只使用中文, 也可以中英文对照, 但不应仅使用英文。