

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.16.020

抗纤灵方对 5/6 肾切小鼠肾组织中基质金属蛋白酶 2 及基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 mRNA 表达的影响

钟利平, 麻志恒, 余柯娜, 何立群*

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海市浦东新区华佗路 280 弄, 201203)

摘要 目的 观察抗纤灵方抗肾纤维化的作用机理。方法 180 只 C57 小鼠随机取出 30 只作为假手术组, 其余 150 只采用 5/6 肾切除方法制作肾功能衰竭模型, 造模成功后随机分为模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、西药组, 每组 30 只。假手术组及模型组给予 0.5 ml 自来水灌胃, 低、中、高剂量组分别给予抗纤灵方水煎剂 (药物剂量依次为 0.2 g/kg、0.4 g/kg、0.8 g/kg) 0.5 ml 灌胃治疗, 西药组给予雷帕霉素溶液 (药物剂量 0.0000016 g/kg) 0.5 ml 灌胃, 每日灌胃 1 次, 各组疗程均为 12 周。在灌胃后第 4、8、12 周末, 每组分别取出 10 只小鼠处死, 检测肾组织中基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP-1) mRNA 的表达。结果 与假手术组比较, 第 4、8、12 周末模型组小鼠 MMP-2 mRNA、TIMP-1 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 在第 8、12 周末低、中、高剂量组和西药组 MMP-2 mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05$), 第 4、8、12 周末低、中、高剂量组 TIMP-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组第 8、12 周末 MMP-2 mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 与本组第 4 周末比较, 低、中、高剂量组第 8、12 周末 TIMP-1 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$)。结论 抗纤灵方抗肾纤维化的作用机理可能与抑制 MMP-2 mRNA 表达、TIMP-1 mRNA 表达相关。

关键词 肾纤维化; 抗纤灵方; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶组织抑制因子 1

肾纤维化是过量的细胞外基质在肾脏沉积, 是许多慢性肾脏病进展至终末期肾病的共同通路, 因此, 抑制过量细胞外基质产生, 保持细胞外基质动态平衡, 是防治肾纤维化的有效措施。研究发现, 细胞外基质的主要成分为蛋白聚糖、胶原、弹性蛋白、纤维连接蛋白等^[1]。在炎症刺激下细胞外基质各种成分将过度分泌, 沉积在肾脏, 引起肾脏结构破坏、功能丧失, 导致肾小球硬化。基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 被看作为蛋白水解酶, 几乎可以降解细胞外基质中的各种蛋白。基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP-1) 是 MMP-2 特异性抑制因子, 能调节 MMP-2 活性。早期临床研究显示, 抗纤灵方可以减少慢性肾功能衰竭患者蛋白尿, 延缓肾功能衰竭进展, 并有抗肾纤维化作用^[2]。为了进一步研究抗纤灵方抗肾纤维化的作用机理, 我们

制作 5/6 肾切除慢性肾功能衰竭模型, 诱导肾纤维化产生, 来探讨抗纤灵方抗肾纤维化机理是否与 MMP-2、TIMP-1 有关。

1 材料与动物

1.1 动物

清洁级雄性 C57 小鼠 180 只, 体重 (18 ± 2) g, 由上海中医药大学动物房提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2008-0016。实验小鼠分笼饲养, 自由饮水, 进食标准普通饲料。

1.2 药物及其制备

抗纤灵方: 丹参 15 g, 桃仁 12 g, 当归 12 g, 牛膝 15 g, 酒大黄 9 g, 由上海曙光医院中药房提供。雷帕霉素粉剂, 10 mg, 上海市威奥生物公司, 批号: R706203。

1.3 主要试剂

Trizol Reagent 总 RNA 抽提试剂盒 (Invitrogen 公司, 批号: 15596-026); 逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号: RR037A); 实时荧光定量试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号: RR420A)。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (81373615); 国家临床重点专科资助; 上海中医临床重点实验室资助; 上海市高校创新团队建设项目 (11DZ1973100)

* 通讯作者: heliquan59@163.com, (021) 5381650 转 7100

1.4 主要设备

荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: CFX-96); 核酸蛋白测定仪 (美国 GE 公司, 型号: NanovueTMPlus); 计算机图像分析仪 (上海复日科技有限公司, 型号: FR-2000); 台式冷冻离心机 (北京时代北利离心机有限公司, 型号: GTR16-2); 匀浆器 (上海复日科技有限公司, 型号: JB50-D)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

180 只 C57 小鼠按随机数字表取出 30 只作为假手术组, 其余 150 只按照 5/6 肾切除方法制备慢性肾功能衰竭模型^[9]。以 2% 戊巴比妥钠 0.07 ml 进行小鼠腹腔注射, 小鼠麻醉后取右侧卧位充分暴露左肾区, 沿左肋脊下缘 1 cm 处消毒, 做斜切口, 在腹膜后取出左肾, 剥离周围脂肪及肾包膜, 再做弧形切口, 主要切除肾皮质大约 0.05 g, 明胶海绵止血, 缝合肌层及皮肤。10 天后再进行右肾全切除。假手术组 30 只进行左、右肾包膜剥离, 保留肾脏及肾上腺。造模 2 周后 150 只慢性肾功能衰竭小鼠根据随机数字表分为模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、西药组各 30 只。假手术组及模型组给予自由进食和 0.5 ml 自来水灌胃。低、中、高剂量组分别给予抗纤灵水煎剂 (药物剂量依次为 0.2 g/kg、0.4 g/kg、0.8 g/kg) 0.5 ml 灌胃, 西药组给予雷帕霉素溶液 (药物剂量为 0.0000016 g/kg) 0.5 ml 灌胃。每日灌胃 1 次, 各组疗程均为 12 周。

2.2 检测指标及方法

在灌胃后第 4、8、12 周末, 每组分别根据随机数字表取出 10 只小鼠处死。取残余肾组织于液氮中速冻后于 -80℃ 冰箱保存, 以待检测 MMP-2 mRNA、TIMP-1 mRNA, 具体操作方法^[9]如下。

总 RNA 抽提: 从液氮中取出肾组织, 采用 Trizol 一步法提取 RNA, 加入适量体积的 DEPC-water 至完全溶解, -80℃ 冻存, 进行电泳与紫外分析检测, 合格后进行后续实验。

RT (逆转录) 反应: 取 Total RNA 1~4 μg 加入到 0.2 ml PCR 管中。加入 Oligo dT 或 Random Primer 1 μl 用 DEPC-water 补充体积至 12 μl。混匀后 70℃ 5 min 后冰浴 3~5 min。在 0.2 ml PCR 管中依次加入: 5 × Reaction buffer 4 μl, Ribolock™ Ribo-nuclease Inhibitor 1 μl, 10 mM dNTP mix 2 μl, Re-

vertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μl, 最终体积为 20 μl。混匀后 42℃ 60 min、70℃ 10 min 后放入 -20℃ 保存。

Real-time PCR 反应: 在 PCR 体系中依次加入: RT 产物或梯度稀释标准品 1 μl, Syb, Green mix 10 μl, Primer 1 (10 μM) 0.4 μl, Primer2 (10 μM) 0.4 μl, ddH₂O 8.2 μl。用封口膜 (荧光定量专用) 覆盖 96 孔 PCR 板, 瞬时离心后放入荧光定量 PCR 仪内, 设定反应条件: 94℃ 1 min 预变性后, 94℃ 15 s→60℃ 34 s→72℃ 15 s (荧光检测), 40 个循环, 72℃ 10 min, 反应完数据保存。由溶解曲线判断 PCR 反应的特异性。每个组别做 3 次定量检测, 记录 CT 值。RT-PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 具体如下: GAPDH: 上游: GCCT-TCCGTGTTCTACC, 下游: AGAGTGGGAGTTGCT-GTTG, 产物长度 183 bp; MMP-2: 上游: TTG-CAGGAGACAAGTTCTGG, 下游: AAGTAGCTAT-GACCACCACCCT, 产物长度 145 bp; TIMP-1: 上游: TGCACAGTGTTCCTGTTT, 下游: GATCTC-CAGGTGCACAAGCCC, 产物长度 152 bp。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件包进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组小鼠不同时间点肾组织中 MMP-2 mRNA 表达水平比较

表 1 示, 与假手术组比较, 第 4、8、12 周末模型组小鼠 MMP-2 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 第 8、12 周末低、中、高剂量组和西药组 MMP-2 mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 第 8、12 周末高剂量组 MMP-2 mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠不同时间点肾组织中基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达水平比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
假手术组	10	1.82 ± 0.56	1.88 ± 0.56	1.81 ± 0.56
模型组	10	2.90 ± 0.43*	3.51 ± 0.33*	4.17 ± 0.43*
低剂量组	10	2.81 ± 0.54	3.21 ± 0.54 [△]	3.01 ± 0.11 [△]
中剂量组	10	2.91 ± 0.44	2.98 ± 0.34 [△]	2.61 ± 0.44 [△]
高剂量组	10	2.92 ± 0.54	2.62 ± 0.15 ^{△▲}	2.52 ± 0.54 ^{△▲}
西药组	10	2.91 ± 0.42	2.31 ± 0.51 [△]	2.21 ± 0.32 [△]

注: 与假手术组同时间点比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间点比较, $\Delta P < 0.05$; 与低剂量组同时间点比较, $\Delta P < 0.05$

3.2 各组小鼠不同时间点肾组织中 TIMP-1 mRNA 表达水平比较

表 2 示, 与假手术组比较, 第 4、8、12 周末模型组小鼠 TIMP-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 第 4、8、12 周末低、中、高剂量组 TIMP-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与本组第 4 周末比较, 第 8、12 周末低、中、高剂量组 TIMP-1 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠不同时间点肾组织中基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 mRNA 表达水平比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
假手术组	10	1.72 ± 0.56	1.79 ± 0.56	1.82 ± 0.56
模型组	10	3.04 ± 0.13*	3.21 ± 0.13*	3.32 ± 0.23*
低剂量组	10	2.89 ± 0.54 [△]	2.81 ± 0.51 ^{△▲}	2.74 ± 0.14 ^{△▲}
中剂量组	10	2.81 ± 0.30 [△]	2.75 ± 0.31 ^{△▲}	2.63 ± 0.30 ^{△▲}
高剂量组	10	2.40 ± 0.21 [△]	2.31 ± 0.21 ^{△▲}	2.15 ± 0.28 ^{△▲}
西药组	10	3.13 ± 0.15	3.33 ± 0.21	3.54 ± 0.28

注: 与假手术组同时点比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时点比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组 4 周末比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

肾纤维化包括肾小球硬化和肾间质纤维化, 肾小球是由入球小动脉和出球小动脉缠绕形成的毛细血管球, 在肾脏呈立体网状分布, 与中医经络学中络脉结构及其相似。中医学无“肾纤维化”一词, 可归属于“关格”“溺毒”等范畴。中医基本病机为病势缠绵, 久病入络, 瘀阻血脉, 浊毒内停造成微型癥积, 据此病机其治疗方法为“活血化瘀, 泻浊补肾”为主。抗纤灵方中丹参性微寒, 补血活血; 桃仁性平, 祛瘀活血; 当归性温, 补血活血; 牛膝性平, 补肾活血; 酒大黄性寒, 清热泻浊活血, 纵观全方以活血为主。现代药理研究显示, 丹参抗纤维化作用主要与抑制 MMP-2、TIMP1 表达相关^[4]。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一组金属依赖的可降解细胞外基质 (ECM) 多种成份的蛋白酶, 在炎症和血管再生中发挥重要作用, 根据作用底物和片段同源性 MMPs 可分为 6 类, 其胶原酶就为其中重要一类, MMP-2 为 IV 胶原酶中未被糖化的一种蛋白酶, 能够降解细胞间基质成分^[5]。MMP-2 主要由成纤维细胞分泌, 损伤后期随着成纤维细胞活化和纤维化形成, MMP-2 活性增加, ECM 降解增快, 导致组织炎性活化, 组织结构破坏^[6]。在肾移植患者组织中发现 MMP-2、TIMP-1 参与慢性活性抗体介导肾排异反应, 与正常组患者相比其

MMP-2、TIMP-1 表达显著升高, 因此认为, MMP-2 和 TIMP-1 的异常表达可能在慢性活性抗体介导肾排异反应导致肾纤维化进展中发挥重要作用^[7]。在动物慢性肾脏病模型中同样发现中重度慢性肾间质小管损伤中 MMP-2 显著表达^[8]。

TIMP-1 是 MMP-2 一个重要抑制剂, 可与有活性或者无活性 MMP-2 结合, 低浓度激活 MMP-2 活性, 高浓度时抑制 MMP-2 分解胶原能力^[9]。研究显示, 在含有糖基化 IV 型胶原培养液中发现, 人系膜细胞表达 IV 胶原显著增高, MMP-2 减少, TIMP-1 显著增加^[10]。在高血压诱导左心室肥厚大鼠实验中发现心肌纤维化组织中 MMP-2、TIMP-1、MMP-2/TIMP-1 比例均高表达^[11]。

本实验结果提示, 与假手术组比较, 模型组 MMP-2、TIMP-1 值显著增高, 说明 MMP-2、TIMP-1 失衡参与肾纤维化发生, 也说明我们造模是成功的。给予抗纤灵方治疗后各治疗组 MMP-2 表达水平均下降, 说明抗纤灵方抗纤维化作用可能与抑制 MMP-2 相关。与低剂量组比较, 高剂量组第 8 周末和第 12 周末 MMP-2 表达水平下降明显, 提示高剂量组效果优于低剂量组。与假手术组比较, 模型组 TIMP-1 值显著增高, 说明肾纤维化时 TIMP-1 表达增高。给予抗纤灵方干预后, 各治疗组 TIMP-1 值均下降, 且与第 4 周末比较, 第 12 周末 TIMP-1 值下降最明显, 说明抗纤灵方对 TIMP-1 抑制作用与时间和剂量都呈依赖关系。

综上所述, 抗纤灵方具有抗肾纤维化作用, 其机理可能与抑制 MMP-2 与 TIMP-1 mRNA 表达量相关, 并且其作用与时间和剂量都呈依赖关系。

参考文献

- [1] 王伟芹, 孙建光, 高占华, 等. 中医药对肝纤维化 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的调控作用 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(8): 161-163.
- [2] 王怡, 何立群, 郑平东. 抗纤灵冲剂治疗慢性肾功能衰竭 60 例疗效研究 [J]. 中医杂志, 2003, 44(12): 925-927.
- [3] 符强, 何立群. 抗纤灵对 5/6 肾切除大鼠肾组织核因子 KB 及肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素 6 mRNA 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 11(19): 2684-2686.
- [4] 胡波, 李峰, 王燕午, 等. 丹参对糖尿病大鼠 MMP-2, TIMP1, TGF- β 和 IV-C 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 3020-3021.
- [5] 李本杨, 王峰. 基质金属蛋白酶家族与膝骨关节炎成因机制相关性研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2014, 26(5): 545-547.

谢红东, 杨柯, 王清兰, 等. 扶正化瘀方对大鼠肾间质 MMP-2 活性调节 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(10): 1570-1573.

Yan Q, Sui W, Wang B, et al. Expression of MMP-2 and TIMP-1 in renal tissue of patients with chronic active antibody-mediated renal graft rejection [J]. Diagn Pathol, 2012, 7: 141. doi: 10.1186/1746-1596-7-141.

Aresu L, Benali S, Garbisa S, et al. Matrix metalloproteinases and their role in the renal epithelial mesenchymal transition [J]. Histol Histopathol, 2011, 26(3): 307-313.

侯元婕, 薛克修. 基质金属蛋白酶及其抑制因子与组

织纤维化的研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 12(3): 204-206.

Anderson SS, Wu K, Nagase H, et al. Effect of matrix glycation on expression of type collagen, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 by human mesangial cell [J]. Cell Adhes Commun, 1996, 4(2): 89-101.

Pang H, Han B, Yu T, et al. The complex regulation of tanshinone II A in rats with hypertension-induced left ventricular hypertrophy [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92216. doi: 10.1371/journal.pone.0092216. ecollection 2014.

Influence of *Kangxianling Decoction* (抗纤灵方) on Expression of Matrix Metalloproteinase 2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 mRNA in Renal Tissue of Mice with 5/6 Nephrectomy

ZHONG Liping, MA Zhiheng, YU Kena, HE Liqun

(Shuguang Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai, 201203)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of anti-renal fibrosis of *Kangxianling Decoction* (抗纤灵方).

Methods Thirty mice were randomly assigned into sham-operated group from 180 C57 mice. The rest 150 mice received 5/6 renal nephrectomy to establish renal failure model, and then they were equally assigned into model group, low dosage group, middle dosage group, high dosage group and western medicine group. Sham-operated group and model groups were given 0.5 ml water. Low, middle and high dosage groups were given 0.5 ml *Kangxianling Decoction*, 0.2 g/kg, 0.4 g/kg and 0.8 g/kg, respectively. Western medicine group was given 0.5 ml sirolimus solution (0.000016 g/kg). All the treatments in every group were given by gavage once a day for 12 weeks. On the fourth, eighth and twelfth weekends, 10 mice in each group were randomly selected to be executed. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) mRNA in renal tissue were detected. **Results** Comparing with sham-operated group, levels of MMP-2 mRNA and TIMP-1 mRNA on the fourth, eighth and twelfth weekends in model group were significantly elevated ($P < 0.01$). Levels of MMP-2 mRNA on the eighth and twelfth weekends in low, middle, high dosage and western medicine groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$); while levels of TIMP-1 mRNA on the fourth, eighth and twelfth weekends in low, middle, high dosage and western medicine groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$). Expressions of MMP-2 mRNA on the eighth and twelfth weekends in high dosage group were significantly lower than those in low dosage group ($P < 0.05$). In low, middle and high dosage groups, expressions of TIMP-1 mRNA were significantly decreased on the eighth and twelfth weekends comparing with those on the fourth weekend ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of anti-renal fibrosis of *Kangxianling Decoction* may be associated with inhibition of MMP-2 mRNA and TIMP-1 mRNA expression.

Keywords renal fibrosis; *Kangxianling Decoction*; matrix metalloproteinase 2; tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA

(收稿日期: 2014-10-16; 修回日期: 2015-01-27)

编辑: 王利菊

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅