

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.11.018

益肾通络方对肾纤维化模型大鼠肾组织转化生长因子- β 1、Smad7 表达的影响

杨智¹, 金红^{1*}, 凌晓¹, 金一², 邹晨曦³, 宋柳江¹, 卢岳华¹

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南省长沙市岳麓区桐梓坡路 371 号, 410013; 2. 湖南省肿瘤医院; 3. 中国人民解放军总医院)

摘要 目的 探讨益肾通络方治疗肾纤维化的可能作用机制。方法 采用阳离子牛血清白蛋白皮下和尾静脉注射建立肾纤维化大鼠模型, 将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、对照组和益肾通络方低、中、高剂量组, 每组各 10 只, 并设 10 只同批正常大鼠为正常组。益肾通络方低、中、高剂量组分别予益肾通络方生药 4.58、9.16、18.32 g/(kg·d) 灌胃, 对照组以肾炎四味片 1.58 g/(kg·d) 灌胃, 模型组和正常组以等容量 (1 ml/100 g) 的蒸馏水灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续 4 周。采用免疫组织化学方法结合图像分析系统测定大鼠肾组织转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、Smad7 的平均灰度值、平均光密度值、阳性细胞数、阳性率, 并进行相关性分析。结果 光镜下模型组肾组织 TGF- β 1 表达明显增多, Smad7 表达不明显。与模型组比较, 益肾通络方各剂量组和对照组肾组织 TGF- β 1 平均灰度值、阳性率、阳性细胞数明显减少, Smad7 平均灰度值、阳性率、阳性细胞数明显提高, 并且以益肾通络方中、高剂量作用更明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相关分析显示, TGF- β 1 与 Smad7 呈线性负相关 ($P < 0.01$)。结论 益肾通络方治疗肾纤维化可能机制是调节 TGF- β 1 与 Smad7 的相互作用关系, 促进 Smad7 表达, 抑制 TGF- β 1 表达。

关键词 肾纤维化; 益肾通络方; 阳离子牛血清白蛋白; 转化生长因子- β 1; Smad7

肾纤维化 (renal fibrosis, RF) 是一种病理生理改变, 是各种肾脏疾病进行性发展的终末阶段和共同转归。我们前期研究显示, 益肾通络方能够保护肾脏功能, 减轻肾脏病理损害, 对肾病综合征有较好的治疗作用^[1-2]; 该方可能是通过改善血液高凝状态^[3]、抑制肾小球系膜细胞增殖^[4]等途径减缓肾纤维化的进程。本文针对肾纤维化中的关键因子, 以阳离子牛血清白蛋白 (cationic bovine serum albumin, C-BSA) 复制的大鼠肾纤维化模型, 观察益肾通络方对肾纤维化大鼠肾组织转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、Smad7 的表达, 并进行定量分析和相关性分析。

1 材料

1.1 实验动物

雄性健康 SD 大鼠 65 只, 清洁级, 8 周龄, 体重 (150 ± 20) g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK(粤) 2003-0001。

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目 (14A094); 湖南省自然科学基金项目 (14JJ4033); 湖南省中医药科研计划项目 (201407)

* 通讯作者: jenny212229@hunnu.edu.cn, (0731) 88912510

1.2 实验药品

益肾通络方组成: 黄芪 20 g, 制何首乌 15 g, 山药 15 g, 茯苓 15 g, 丹参 10 g, 当归 10 g, 芡实 20 g, 马鞭草 10 g 等, 购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科。肾炎四味片, 湖北亿雄祥瑞药业有限公司生成, 批号: Z42021954, 每片 0.36 g, 成人日用量 8.64 g。

1.3 主要试剂与仪器

C-BSA (批号: 36F94781)、TGF- β 1 试剂盒 (批号: BA0245)、Smad7 试剂盒 (批号: BA1405)、SABC 免疫组化染色试剂盒 (批号: AK2038)、DAB 显色试剂盒 (批号: AR1022) 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 弗氏不完全佐剂 (美国 Sigma 公司, 批号: 140101)。DM LB2 型双目显微镜 (德国 Leica 公司), Motic B5 显微摄像系统 (麦克奥迪实业集团公司), MIAS-4400 医学图像分析系统 (北京炳洋科技有限公司)。

1.4 动物分组及模型制备

65 只大鼠采用随机数字表法抽取 10 只作为正常组, 其余 55 只根据 Border 等^[5]方法及预实验结

果建立肾纤维化大鼠模型: 1) 将 60 mg C-BSA 用 30 ml PBS 充分溶解, 制成 2 mg/ml C-BSA 溶液, 再与等量 (30 ml) 的弗氏不完全佐剂置乳钵内充分混匀为乳白色悬液, 使乳化完全。2) 称取 C-BSA 1625 mg, 与 650 ml PBS 充分混匀, 制成 2.5 mg/ml C-BSA 溶液。3) 将 C-BSA 冷冻干燥后测等电点 (pI), $pI = 10$, 贮存在 -80°C 超低温冰箱中备用。4) 造模前将大鼠放入代谢笼中, 每笼 1 只, 收取大鼠 24 h 尿液, 进行 24 h 尿蛋白定量测定。55 只大鼠均施行以下操作: 先取 1 ml 上述 1) 中乳白色悬液, 分别一次性于每只大鼠的双侧腋下、腹股沟处作多点皮下注射, 观察 1 周; 之后每只大鼠隔日尾静脉注射 1 ml 上述 2) 中 2.5 mg/ml C-BSA 4 mg, 共 3 周; 再根据 24 h 尿蛋白定量测定结果, 采用随机数字表法抽取 5 只造模大鼠进行肾组织病理学检查。当造模大鼠出现大量蛋白尿, 肾小球系膜细胞、系膜基质增加, 肾小管上皮细胞明显水肿、部分坏死脱落, 部分小管腔内可见蛋白管型, 并可见间质炎细胞浸润, 判断造模成功^[4]。将模型制作成功的 50 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、对照组和益肾通络方低、中、高剂量组, 每组 10 只。

1.5 给药方法

根据成人与大鼠用药剂量换算法^[5], 以成人等效剂量为中剂量, 益肾通络方低、中、高剂量组分别予益肾通络方 4.58、9.16、18.32 g/(kg·d) 灌胃; 对照组以肾炎四味片 1.58 g/(kg·d) 灌胃, 模型组和正常组以等容量 (1 ml/100 g) 的蒸馏水灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续 4 周。

1.6 观察指标及方法

实验第 8 周末, 全部大鼠断头处死, 剖腹取肾脏。切取 1 cm 大小的肾组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片 (厚 4~5 μm) 常规脱蜡脱水。免疫组化 SABC 法检测肾组织 TGF- β 1、Smad7 的分布情况, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。使用 DAB 显色试剂盒, 取 1 ml 蒸馏水, 加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片; 室温显色, 镜下控制反应时间, 一般 5~20 min; 蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染; 脱水, 透明, 封片; 显微镜观察。所有图像结果用计算机图像分析系统进行定量分析: 切片于光镜下 400 倍放大, 经显微摄像系统随机摄取 5 个视野, 通过图像分析系统分别测定平均灰度值、阳性率 (即面密度 = 目标面积/统计场面积)、阳性细胞数、平均光密度。结果判断: 阳性细胞膜和细胞浆着色呈棕黄色。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用方差分析, 组间两两比较用 LSD 检验; 相关分析采用 Pearson 相关分析法。

2 结果

模型组大鼠于实验第 6 周死亡 2 只, 益肾通络方各剂量组于实验第 7 周各死亡 1 只, 可能是由于感染所致; 对照组大鼠在实验中未出现死亡。

2.1 各组大鼠肾组织光镜下 TGF- β 1、Smad7 分布情况

TGF- β 1、Smad7 均表达于肾小球毛细血管基底膜、肾小管基底膜周围和肾间质, 阳性表达是细胞膜和细胞浆呈棕黄色。1) TGF- β 1 分布: 正常组肾小球毛细血管基底膜和间质区有一定表达; 模型组肾小球毛细血管基底膜和间质区表达明显增多, 系膜明显增生, 伴细胞水肿, 且与间质增宽及炎细胞浸润程度一致; 益肾通络方各剂量组和对照组表达明显减少, 细胞水肿减轻。2) Smad7 分布: 正常组表达较少; 模型组肾小球毛细血管基底膜和间质区表达不明显, 肾小管上皮细胞水肿伴灶性坏死; 益肾通络方各剂量组和对照组肾小球毛细血管基底膜和间质区表达明显增多, 肾小管上皮细胞水肿明显减轻。

2.2 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 表达定量结果比较

表 1 示, 与正常组比较, 其余各组大鼠肾组织 TGF- β 1 平均灰度值、阳性率、阳性细胞数明显升高, 平均光密度值明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 益肾通络方各剂量组和对照组肾组织中 TGF- β 1 的平均灰度值、阳性率和阳性细胞数降低, 平均光密度值升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。益肾通络方中、高剂量组在降低平均灰度值和阳性率方面优于对照组和益肾通络方低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肾组织 Smad7 表达定量结果比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织 Smad7 阳性细胞数明显升高 ($P < 0.05$), 而平均灰度值、阳性率和平均光密度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 对照组和通络益肾方各剂量组肾组织 Smad7 平均灰度、阳性率、阳性细胞数明显高于模型组, 益肾通络方中、高剂量组平均光密度值低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。益肾通络方高剂量组肾组织中 Smad7 的平均灰度值、阳性率、阳性细胞数显著高于对照组, 而平均灰度值、阳性率

表 1 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 表达定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均灰度值	阳性率 (%)	阳性细胞数 (个)	平均光密度值
正常组	10	118.27 $\pm$ 20.58	3.19 $\pm$ 1.04	118.00 $\pm$ 23.60	0.27 $\pm$ 0.04
模型组	8	184.10 $\pm$ 13.37**	12.02 $\pm$ 1.73**	294.63 $\pm$ 78.29**	0.13 $\pm$ 0.05**
对照组	10	154.64 $\pm$ 9.82** $\Delta\Delta$	7.19 $\pm$ 2.30** $\Delta\Delta$	205.20 $\pm$ 42.59** $\Delta\Delta$	0.17 $\pm$ 0.02** $\Delta\Delta$
益肾通络方低剂量组	9	153.21 $\pm$ 6.21** $\Delta\Delta$	7.59 $\pm$ 2.25** $\Delta\Delta$	218.00 $\pm$ 45.37** $\Delta\Delta$	0.16 $\pm$ 0.04** Δ
益肾通络方中剂量组	9	139.87 $\pm$ 13.61** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	5.38 $\pm$ 2.08** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	178.44 $\pm$ 66.42** $\Delta\Delta$	0.18 $\pm$ 0.03** $\Delta\Delta$
益肾通络方高剂量组	9	133.74 $\pm$ 10.41** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	5.21 $\pm$ 1.78** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	169.11 $\pm$ 59.79** $\Delta\Delta$	0.19 $\pm$ 0.01** $\Delta\Delta\Delta$

注: TGF- β 1, 转化生长因子 β 1; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与益肾通络方低剂量组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 2 各组大鼠肾组织 Smad7 表达定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均灰度值	阳性率 (%)	阳性细胞数 (个)	平均光密度值
正常组	10	92.37 $\pm$ 15.18	2.73 $\pm$ 2.05	91.00 $\pm$ 46.25	0.34 $\pm$ 0.09
模型组	8	118.14 $\pm$ 25.56	5.12 $\pm$ 2.10	131.00 $\pm$ 49.06*	0.31 $\pm$ 0.10
对照组	10	150.08 $\pm$ 26.24** Δ	9.06 $\pm$ 2.18** Δ	169.60 $\pm$ 23.70** Δ	0.27 $\pm$ 0.05*
益肾通络方低剂量组	9	150.33 $\pm$ 17.62** Δ	10.06 $\pm$ 3.56** $\Delta\Delta$	201.22 $\pm$ 39.75** $\Delta\Delta$	0.29 $\pm$ 0.05
益肾通络方中剂量组	9	156.13 $\pm$ 38.19** Δ	14.64 $\pm$ 5.39** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	190.22 $\pm$ 42.57** $\Delta\Delta$	0.23 $\pm$ 0.06** Δ
益肾通络方高剂量组	9	181.76 $\pm$ 52.64** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	16.48 $\pm$ 6.21** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	212.67 $\pm$ 31.53** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.23 $\pm$ 0.05** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与益肾通络方低剂量组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

高于益肾通络方低剂量组, 平均光密度值低于益肾通络方低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠肾组织 TGF- β 1、Smad7 表达的相关性分析

以阳性率、平均灰度值、阳性细胞数和平均光密度值对各组 TGF- β 1 与 Smad7 进行相关分析, 结果如下: 以阳性率分析, $r = -0.75$, $P < 0.01$; 以平均灰度分析, $r = 0.021$, $P > 0.05$; 以阳性细胞数分析, $r = -0.056$, $P > 0.05$; 以平均光密度分析, $r = 0.057$, $P > 0.05$ 。从专业角度分析, 平均灰度值和平均光密度值反映免疫组化染色的强度, 阳性率和阳性细胞数反映免疫组化表达的数量, 它们从不同角度说明 TGF- β 1 与 Smad7 之间的相关性, 其结果不一定同向同步; 从统计学的角度分析, 阳性率 $P < 0.01$, 其他三个指标 $P > 0.05$, 说明从阳性率角度分析 TGF- β 1 与 Smad7 之间存在相关性。综合分析说明, 从阳性率对各组进行相关性分析, TGF- β 1 与 Smad7 之间存在线性负相关。

3 讨论

中医学根据肾纤维化的临床表现, 将之归属于“水肿”“虚劳”“腰痛”“关格”“癃闭”等范畴。其病因病机以虚损为主, 涉及肺脾肾肝, 又可见湿热瘀毒^[8]。治疗方法常用补益脾肾、活血消癥、利湿泄浊、清热解毒等。益肾通络方是课题组长期临床实践化裁而成的中药复方, 在补肾方面, 方中黄芪补气升阳, 制何首乌补肝肾益精血, 山药补脾肾, 配以当归补血、芡实甘涩益肾固精; 在化瘀方

面, 当归、丹参、马鞭草相合, 活血化瘀通络; 茯苓甘则能补, 淡则能渗。以上诸药合用, 有补泻同用、收散兼顾的特点, 共奏补肾化瘀之功。

肾脏纤维化病理机制具有复杂性, 实验证明, 各种炎性介质^[9]如脂多糖、白细胞介素 1 (IL-1)、白细胞介素 6 (IL-6), 各种致纤维化因子^[10]如血小板源生长因子、转化生长因子- β (TGF- β); 以及一些基质成分^[11], 如基质金属蛋白酶和基质金属蛋白酶组织抑制因子等, 这些因素之间存在着非常复杂的相互作用。研究显示, TGF- β 1 是一种致纤维化因子, 是肾脏纤维化发生、发展中的必需因子, 而 Smad 蛋白是目前所知的唯一 TGF- β 受体的胞内激酶底物, 介导了 TGF- β 的胞内信号转导; Smad7 蛋白是 TGF- β 1 细胞内信号转导的负调控蛋白, 可表达于肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞内^[12-13]。因此, TGF- β 1/Smad7 的相关性成为我们研究肾脏纤维化干预机制的着眼点。

本研究我们采用免疫组织化学方法, 能大面积地显示 TGF- β 1、Smad7 在肾小球毛细血管基底膜、肾小管基底膜周围和肾间质的分布。结合计算机图像分析技术测定了其含量, 结果显示: 从平均灰度值、阳性率、阳性细胞数、平均光密度值等多角度观察和定量分析, 模型组大鼠 TGF- β 1 在肾小球毛细血管基底膜和间质区的表达明显增多, 而 Smad7 表达不明显。益肾通络方各剂量组和对照组的 TGF- β 1 在肾小球毛细血管基底膜和间质区的沉积明显减少, 而 Smad7 的表达却明显提高, 并以益肾通络方中、高剂量为佳。通过对 TGF- β 1、

Smad7 的免疫组织化学的结果进行相关性分析, 我们发现从阳性率角度对各组进行相关分析, TGF- β 1 与 Smad7 在各个组的变化存在线性负相关。因此, 我们认为, 益肾通络方可能通过调节 TGF- β 1 和 Smad7 的相互作用关系, 促进 Smad7 表达, 抑制 TGF- β 1 表达, 这可能是其干预肾纤维化进程的重要机制之一。

参考文献

- [1] 金红, 杨智, 刘慧萍, 等. 益肾通络方对 C-BSA 肾病综合征大鼠模型的整体治疗作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(10): 1597-1600.
- [2] 卢岳华, 陈小光, 金红, 等. 补肾通络方治疗肾病综合征的临床观察 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 47-49.
- [3] 汪保和, 皮亦华, 黄畅, 等. 补肾通络方对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾炎大鼠高凝状态的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 10-13.
- [4] 金红, 易宇新, 卢岳华, 等. 益肾通络方对体外大鼠肾小球系膜细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(7): 505-506.
- [5] BORDER WA, WARD HJ, KAMIL ES, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of

- an exogenous cationic antigen [J]. J Clin Invest, 1982, 69(2): 451-461.
- [6] 李玉林. 病理学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 264-273.
- [7] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2003: 48.
- [8] 刘晓倩, 闫军堂, 马春雷, 等. 肾间质纤维化中医病因病机的认识探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(12): 2373-2376.
- [9] NAHAS AM, MUCHANETA KUBARA EC, ESSAWY M, et al. Renal fibrosis: insights into pathogenesis and treatment [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29(1): 55-62.
- [10] BAUD L, FOUQUERAY B, BELLOCQ A. Inflammatory mechanisms of renal fibrosis: glomerulonephritis [J]. Bull Acad Natl Med, 1999, 183(1): 23-31.
- [11] 王文新, 李大勇, 陈香美. 基质金属蛋白酶与硬化性肾脏病 [J]. 北京医学, 2004, 26(1): 65-66.
- [12] ATTISANO L, WRANA JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily [J]. Science, 2002, 296(5573): 1646-1647.
- [13] 王水华, 陈帮明, 刘永芳, 等. 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 [J]. 中医杂志, 2015, 56(9): 792-795.

Effects of *Yishen Tongluo Fang* (益肾通络方) on Expression of Transforming Growth Factor- β 1 and Smad7 in Renal Tissue of Renal Fibrosis Model Rats

YANG Zhi¹, JIN Hong¹, LING Xiao¹, JIN Yi², ZOU Chenxi³, SONG Liujiang¹, LU Yuehua¹

(1. School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha, Hunan, 410013; 2. Hunan Cancer Hospital; 3. Chinese PLA General Hospital)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Yishen Tongluo Fang* (益肾通络方) in treating renal fibrosis. **Methods** Built rat models with renal fibrosis by subcutaneous and caudal vein injecting cationic bovine serum albumin. Fifty successful models were randomly divided into model group, control group and the low, medium and high dose groups of *Yishen Tongluo Fang* group, 10 rats in each group, and the same batch of 10 normal rats were picked out into normal group. The low, medium and high dose groups of *Yishen Tongluo Fang* group were respectively given *Yishen Tongluo Fang* 4. 58, 9. 16 and 18. 32 g/ (kg · d) to gavage. The control group was given *Shenyan Siwei Pian* (肾炎四味片) 1. 58 g/ (kg · d) to gavage and the model group and the normal group were given distilled water (1 ml/100 g) with the same capacity to gavage, once a day for four weeks. Measure the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), average grey value of Smad7, average optical density value, number of positive cells and positive rate in the renal tissue of rats using immunohistochemical method combining with system of image analysis and made correlation analysis. **Results** The expression of TGF- β 1 of the renal tissue in the model group under optical microscope was obviously increased, but Smad7 was unobviously expressed. Compared with the model group, TGF- β 1 average grey value, positive rate and the number of positive cells of renal tissue decreased significantly in each dose group of *Yishen Tongluo Fang* and the control group. The average grey value of Smad7, positive rate and the number of positive cells obviously increased and effects were more remarkable in medium and high dose of *Yishen Tongluo Fang* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The correlation analysis showed that the correlation between TGF- β 1 and Smad7 was linear negative ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanisms of *Yishen Tongluo Fang* treating renal fibrosis may adjust the interaction relations between TGF- β 1 and Smad7, promote the expression of Smad7 and inhibit the expression of TGF- β 1.

Keywords renal fibrosis; *Yishen Tongluo Fang* (益肾通络方); cationic bovine serum albumin; transforming growth factor- β 1; Smad7

(收稿日期: 2015-06-10; 修回日期: 2015-01-18)

编辑: 邓 媛