

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.18.015

黑地黄丸对肾纤维化模型大鼠肾组织炎症因子及 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路的影响

孙响波^{1,2}, 李永伟¹, 孙红¹, 王嵩¹, 李伟^{2*}

(1. 青岛市海慈医疗集团, 山东省青岛市人民路 4 号, 266000; 2. 山东中医药大学)

摘要 目的 观察黑地黄丸对肾纤维化大鼠肾组织微炎症状态的影响及可能作用机制。方法 将 50 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组和黑地黄丸高、中、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组大鼠均采用 5/6 肾切除法建立肾纤维化动物模型。从术后当日, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠分别给予含生药 2、1、0.5 g/ml 药液按 10 ml/kg 灌胃, 模型组与正常组给予同等体积生理盐水, 每天 1 次。连续给药 60 天后, 检测各组大鼠血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN)、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 水平, HE 染色观察大鼠肾组织病理变化, 免疫组化和 Western blot 法检测肾组织 Toll 样受体 2 (TLR₂)、核转录因子 κB (NF-κB)、髓样分化因子 88 (Myd88) 蛋白表达, 免疫组化法检测肾组织炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF-α)、白细胞介素 6 (IL-6) 表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 水平明显升高, 肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88、TNF-α、IL-6 表达亦升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 水平明显降低, 肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88、TNF-α、IL-6 表达亦降低 ($P < 0.05$); 黑地黄丸高、中、低剂量组组间比较, 各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HE 染色结果显示, 模型组大鼠肾小球变形、肾小管间质增宽, 炎性细胞浸润, 而黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠肾间质水肿、肾小球硬化、肾小管萎缩和炎性细胞浸润较模型组减轻, 并且各剂量组之间差异不明显。结论 黑地黄丸能明显改善肾纤维化大鼠肾组织微炎症状态, 其作用机制可能与调节肾组织 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路有关。

关键词 黑地黄丸; 肾纤维化; 炎症因子; Toll 样受体 2; 髓样分化因子 88; 核转录因子 κB

微炎症与肾纤维化密切相关, 是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 病情进展的重要因素^[1], 通过早期调控肾纤维化程度及微炎症状态, 对减轻肾损伤、保护肾功能具有重要意义。有研究^[2-3]表明, Toll 样受体 2 (TLR₂) 与肾组织纤维化程度及持续炎症反应相关, 可通过髓样分化因子 88 (Myd88) 依赖途径激活核转录因子 κB (NF-κB), 导致肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 等炎性因子上调, 促进微炎症发生。因此, 干预或阻断 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路有助于延缓 CKD 的进展。黑地黄丸出自张元素《素问病机气宜保命集》, 有补脾益肾功效, 主治脾肾不足证, 临床治疗慢性肾衰竭、肾性贫血疗效确定^[4-5]。前期研究^[6]发现, 黑地黄丸通过下调肾组织转化生长因子 β1 (TGF-β1)、结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达, 具有抗肾纤维化

的作用。本研究采用 5/6 肾切除法造成肾纤维化模型, 观察黑地黄丸抗纤维化、改善微炎症作用及其对 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白的影响, 探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 50 只, 8 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 山东大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (鲁) 20090001。饲养于山东中医药大学实验动物中心, 温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 (55 ± 2) %, 自由摄食饮水。

1.2 实验药物

黑地黄丸组成: 熟地黄 12 g、苍术 12 g、干姜 6 g、大枣 6 g, 上药加水煎煮 2 次, 煎液过滤合并, 浓缩至浸膏, 加乙醇使含醇量至 50%, 冷藏 24 h, 取上清液回收乙醇, 温开水溶化后分别水浴浓缩成含生药 2、1、0.5 g/ml 的高、中、低浓度药液,

基金项目: 山东中医药科技发展计划 (2017-333)

* 通讯作者: lweidw@163.com

4℃ 冰箱保存备用。

1.3 实验试剂和仪器

肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN)、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 检测试剂盒 (北京利德曼公司, 批号分别为 0758、3454、30515D); TLR₂ 抗体、Myd88 抗体、NF-κB 抗体 (Affinity 抗体公司, 批号分别为 990387W1、YSIY11W、990209W); TNF-α 抗体、白细胞介素 6 (IL-6) 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 3090401、0826A09); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 101964、2171A08); 水合氯醛 (山东大学齐鲁医院, 批号 20120702); HE 染色试剂盒、SDS-聚丙烯酰胺凝胶、RIPA 裂解液、BSA-TBST (索莱宝科技有限公司, 批号分别为 G1120、P1200、P1010、G1304); ECL 试剂盒 (凯基生物科技股份有限公司, KGP1123)。

全自动酶标仪 (赛默飞世尔仪器有限公司, EL340i 型); 全自动高速冷冻离心机 (湖南仪器仪表总厂离心机厂, GL20A 型); 电热恒温水浴箱 (上海博迅实业有限公司, SSW 型); 切片机 (德国 Leica 公司, RM2235 型)。

1.4 动物造模、分组及给药

50 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组和黑地黄丸高、中、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组大鼠参照《人类疾病动物模型的复制》^[1] 中方法建立肾纤维化大鼠模型: 以 10% 水合氯醛麻醉, 先切除左肾 2/3 肾组织, 后于 1 周后切除整个右肾, 造模 4 周后检测尿素氮、肌酐等血生化指标验证是否造模成功^[2]。从术后当天开始, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠分别给予含生药 2、1、0.5 g/ml 药液按 10 ml/kg 灌胃, 模型组与正常组给予同等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 60 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 血清 Cr、BUN、hs-CRP 水平测定 于手术后第 60 天腹主动脉采血, 静置 30 min, 5000 r/min (半径 15 cm) 离心 15 min, 取血清, 应用检测试剂盒通过酶标仪检测相应波段的吸光度值。

1.5.2 肾组织 HE 染色 取左侧部分肾组织, 以石蜡包埋肾组织按常规方法操作进行 HE 染色, 观察大鼠肾组织病理变化。

1.5.3 免疫组化法检测肾组织 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白表达 取各组大鼠肾组织石蜡

包埋, 4 μm 切片, 常规烤片、脱蜡复水, 加入 3% 过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶, 置于枸橼酸钠溶液中抗原修复, 山羊血清封闭 10 min, 滴加一抗为 TLR₂ (1: 200)、Myd88 (1: 200)、NF-κB (1: 200), 4℃ 孵育过夜; 次日加山羊抗兔/大鼠二抗工作液, 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色 8 min, 苏木素复染, 常规脱水、透明、封片, 阳性表达信号为组织呈黄棕色。每例切片选取 10 个视野 (×200), 采用 Image-Pro Plus 6.0 分析。

1.5.4 Western blot 法检测肾组织 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白表达 肾组织剪碎后应用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 法定量蛋白浓度, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 5% BSA-TBST 室温下封闭 1h, 加一抗为 TLR₂ (1: 1000)、Myd88 (1: 1000)、NF-κB (1: 1000), 4℃ 孵育过夜, PBST 充分洗膜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h, PBST 洗膜, ECL 检测液成像, 采用显影结果使用 Quantity One V4.6.6 进行 OD 值分析, 结果用 β-actin 校正。

1.5.5 肾组织中炎症因子表达 采用免疫组化法检测, 方法同 1.5.3, 滴加一抗为 TNF-α (1: 200)、IL-6 (1: 200), 4℃ 孵育过夜; 次日加山羊抗兔/大鼠二抗工作液, DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水、透明、封片, 每例切片选取 10 个视野 (×200), 使用 Image-Pro Plus 6.0 分析 TNF-α、IL-6 的表达。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计, 计量数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数比较使用单因素方差分析, 方差齐性者组间两两比较选 S-N-K, 方差不齐者使用 Dunnett's T^3 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清 Cr、

表 1 各组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Cr (μmol/L)	BUN (mmol/L)	hs-CRP (μg/L)
正常组	10	35.7 ± 8.4	6.5 ± 0.2	3.4 ± 0.3
模型组	10	90.2 ± 9.8*	9.7 ± 0.6*	7.8 ± 0.6*
黑地黄丸高剂量组	10	68.6 ± 3.3 [△]	7.2 ± 0.4 [△]	4.1 ± 0.1 [△]
黑地黄丸中剂量组	10	79.8 ± 2.8 [△]	8.5 ± 0.2 [△]	4.8 ± 0.2 [△]
黑地黄丸低剂量组	10	87.1 ± 3.5 [△]	8.7 ± 0.3 [△]	5.3 ± 0.4 [△]

注: Cr, 肌酐; BUN, 尿素氮; hs-CRP, 超敏 C 反应蛋白; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠肾脏组织中 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白免疫组化检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR ₂	NF-κB	Myd88
正常组	10	0.012 ± 0.050	0.042 ± 0.030	0.005 ± 0.001
模型组	10	0.158 ± 0.010*	0.255 ± 0.020*	0.028 ± 0.004*
黑地黄丸高剂量组	10	0.072 ± 0.040 ^Δ	0.143 ± 0.010 ^Δ	0.015 ± 0.002 ^Δ
黑地黄丸中剂量组	10	0.092 ± 0.060 ^Δ	0.162 ± 0.050 ^Δ	0.019 ± 0.001 ^Δ
黑地黄丸低剂量组	10	0.121 ± 0.020 ^Δ	0.214 ± 0.040 ^Δ	0.024 ± 0.003 ^Δ

注: TLR₂, Toll 样受体 2; NF-κB, 核转录因子 κB; Myd88, 髓样分化因子 88; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

BUN、hs-CRP 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 水平明显降低 ($P < 0.05$); 黑地黄丸高、中、低剂量组组间比较, 各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠肾脏组织病理学改变

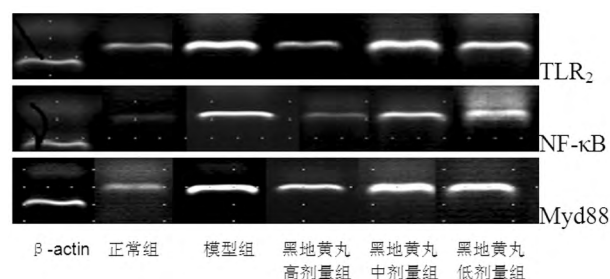
HE 染色结果显示, 正常组大鼠肾皮质结构清楚, 肾小管及肾小球的大小、形态正常, 肾小管间质无增宽、无明显充血及炎细胞浸润。模型组大鼠可见肾皮质变薄、皮髓质结构交界不清, 肾小球变形、肾小管间质增宽, 肾间质可见不同程度的水肿、纤维组织增生、炎性细胞浸润, 部分肾小球可见硬化、肾小管可见萎缩, 呈慢性进行性肾病的改变。黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠可见肾间质增宽, 但肾间质水肿、肾小球硬化、肾小管萎缩和炎性细胞浸润不如模型组明显, 而各剂量组之间差异不明显。

2.3 各组大鼠肾组织中 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白免疫组化检测结果比较

表 2 示, 模型组大鼠肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达明显高于正常组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 而黑地黄丸高、中、低剂量组组间比较, 肾组织 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠肾组织 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白 Western blot 检测结果比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 而黑地黄丸高、中、低剂量组组间比较, 肾组织 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达电泳图见图 1。



注: TLR₂, Toll 样受体 2; NF-κB, 核转录因子 κB; Myd88, 髓样分化因子 88

图 1 各组大鼠肾组织中 TLR₂、NF-κB、Myd88 蛋白表达电泳图

表 3 各组大鼠肾组织 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路相关蛋白 Western blot 检测结果比较 (β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR ₂	NF-κB	Myd88
正常组	10	1.58 ± 0.47	1.22 ± 0.85	0.06 ± 0.33
模型组	10	6.27 ± 0.51*	5.77 ± 0.78*	0.68 ± 0.12*
黑地黄丸高剂量组	10	1.98 ± 0.53 ^Δ	2.61 ± 0.36 ^Δ	0.25 ± 0.11 ^Δ
黑地黄丸中剂量组	10	3.14 ± 0.82 ^Δ	3.55 ± 0.29 ^Δ	0.43 ± 0.05 ^Δ
黑地黄丸低剂量组	10	3.46 ± 0.65 ^Δ	3.72 ± 0.48 ^Δ	0.48 ± 0.02 ^Δ

注: TLR₂, Toll 样受体 2; NF-κB, 核转录因子 κB; Myd88, 髓样分化因子 88; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.5 各组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-6 表达比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-6 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黑地黄丸高、中、低剂量组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-6 表达降低 ($P < 0.05$); 而黑地黄丸高、中、低剂量组组间比较, 肾组织 TNF-α、IL-6 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠肾组织 TNF-α、IL-6 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF-α	IL-6
正常组	10	0.012 ± 0.003	0.016 ± 0.012
模型组	10	0.113 ± 0.014*	0.147 ± 0.025*
黑地黄丸高剂量组	10	0.058 ± 0.002 ^Δ	0.076 ± 0.019 ^Δ
黑地黄丸中剂量组	10	0.078 ± 0.007 ^Δ	0.092 ± 0.021 ^Δ
黑地黄丸低剂量组	10	0.085 ± 0.022 ^Δ	0.102 ± 0.028 ^Δ

注: TNF-α, 肿瘤坏死因子 α; IL-6, 白细胞介素 6; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

中医学认为,肾纤维化是一个正气耗损、毒邪壅滞、持续正邪相争、邪盛正虚的过程,其病理机制属于本虚标实,本虚指气虚,脾肾两脏最常受累,标实为湿浊、血瘀,本虚与标实相互影响,互为因果。中医学治疗肾纤维化,主要以补益脾肾、活血解毒、利湿化浊为主^[9]。黑地黄丸方中熟地黄性温味甘,可滋阴养血、填精益髓,能大补五脏真阴、填阴壮水,为养血补虚之要药;苍术性温、味辛苦,为太阴经引经药,外能开肌腠、温肌表、散寒邪,内可燥湿邪、健脾气、化胃浊,为治脾湿之要药;两药药量相同,同为君药,配伍后具补泻兼施、标本两顾、刚柔互济之特点。佐以干姜,其性热味辛,归脾肾经,为温中焦脾土之要药,在方中蕴意有二,一者温中散寒,微微少火以生肾气,助熟地黄以补肾,助苍术以化湿;二者干姜壮脾气,制约熟地黄滋腻之性,以防熟地黄助湿碍脾。大枣为使,性味苦平,功在补中、健脾和胃、养血安神。四药相合滋阴养血不碍湿,辛散温通不助热,集补、润、温、养于一方,且“丸者缓也”,吸收慢,作用持久,药简效强,治脾肾两脏之虚,燥脾湿除肾燥,使脾胃健运,肾气充盛,为滋水燥湿、滋液沁脾之良方^[10]。

炎症反应是启动肾纤维化的重要因素,纤维化的发生、发展始终伴随微炎症反应^[11]。近年来 Toll 样受体被认为是诱导炎症反应的主要因素,参与肾脏急性慢性组织炎症反应,而 TLR₂ 在肾脏的高表达具有促进纤维化的作用^[12-13]。TLR₂ 通过 Myd88 依赖途径,激活 NF-κB,诱发炎症因子 IL-6、TNF-α 的表达,参与 CKD 微炎症状态的发生与发展^[14-16]。研究显示,IL-6、CRP 水平与肾脏 NF-κB 表达呈正相关,抑制 NF-κB 蛋白表达,可改善微炎症反应^[17]。CRP 是微炎症的标志物,参与炎症过程本身并可促进其他炎症介质^[18]。

本研究结果显示,模型组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 含量明显升高,肾组织病理显示肾皮质变薄、皮髓质结构交界不清,肾小球变形、肾小管间质增宽,肾间质可见不同程度的水肿、纤维组织增生、炎性细胞浸润,证明模型组大鼠存在肾功能损害、微炎症状态。黑地黄丸各剂量组大鼠血清 Cr、BUN、hs-CRP 含量明显降低,肾组织病理变化也得到改善,证实黑地黄丸可通过对肾功能的保护减缓肾纤维化进程。Western blot 及免疫组化结果均

显示,模型组大鼠肾组织 TLR₂、NF-κB、Myd88、TNF-α、IL-6 蛋白表达较正常组升高,说明模型组大鼠在发生肾纤维化的同时炎症反应亦呈高表达状态,而黑地黄丸各剂量组均能下调 TLR₂、NF-κB、Myd88、TNF-α、IL-6 蛋白表达,证明黑地黄丸具有调控微炎症状态的作用,与通过下调 TLR₂/NF-κB/Myd88 通路各节点分子蛋白的表达有关。而黑地黄丸高、中、低剂量组各指标差异无统计学意义,可能跟实验设计大鼠样本量较小或干预时间较短有关,需进一步扩大样本量和延长观察时间。

参考文献

- [1] JEREMY S, DUFFIELD D. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis [J]. Clin Invest, 2014, 124(6): 2299-2306.
- [2] 段分分, 杨雯雯, 邵云侠, 等. 芍药苷对糖尿病小鼠肾组织中 TLR₂ 信号通路的调节作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1252-1258.
- [3] MUDALIAR H, POLLOCK C, PANCHAPAKESAN U. Role of Toll-like receptors in diabetic nephropathy [J]. Clin Science (Lond), 2014, 126(10): 685-694.
- [4] 张丽, 张法荣. 古方“黑地黄丸”辨析 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(11): 2731-2733.
- [5] 张法荣. 黑地黄丸治疗慢性肾衰竭的临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(2): 156-157.
- [6] 张法荣, 孟志云, 赵平, 等. 熟地、苍术及两者不同配伍比例保护大鼠残余肾和抑制转化生长因子的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2): 39-42.
- [7] 李才. 人类疾病动物模型的复制 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 327.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1238-1239.
- [9] 吉晶, 何立群. 中西医防治肾纤维化的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 221-228.
- [10] 孙响波, 于妮娜, 周长磊, 等. 黑地黄丸治疗慢性肾衰的组方机制探析 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(9): 1802-1803.
- [11] JEREMY S, DUFFIELD D. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2299-2306.
- [12] GU J, LIU Y, XIE B, et al. Roles of toll-like receptors: from inflammation to lung cancer progression [J]. Biomed Rep, 2018, 8(2): 126-132.
- [13] WEST AC, TANG K, TYE H, et al. Identification of a TLR₂-regulated gene signature associated with tumor cell growth in gastric cancer [J]. Oncogene, 2017, 36(36): 5134-5144.
- [14] BYRD-HEIFER CA, BLOCK EF, TAKEDA K, et al. The

role of Myd88 and TLR4 in the Ps-mimetic activity of Taxol [J]. Eur J Immunol, 2016, 31(8) : 2448-2457.

[5] 刘红, 孙伟, 万毅刚, 等. 慢性肾脏病肾组织炎症信号通路 NF- κ B 的调节机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24) : 4246-4250.

[6] MATOBA K, KAWANAMI D, TSUKAMOTO M, et al. Rho-kinase regulation of TNF- α induced nuclear translocation of NF- κ B Rel A/p65 and M-CSF expression via p38 MAPK in mesangial cells [J]. Am J Physiol Renal

Physiol, 2014, 307(5) : F571-F580.

[7] WANG DT, HUANG RH, CHENG X, et al. Tanshinone II A attenuates renal fibrosis and inflammation via altering expression of TGF- β /Smad and NF- κ B signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 26(1) : 4-12.

[8] PANICHI V, MIGLIORI M, DE PIETRO S, et al. C-reactive protein as a marker of chronic inflammation in uremic patients [J]. Blood Purif, 2000, 18(3) : 183-190.

Effects of *Heidi Huang Pills* (黑地黄丸) on Renal Tissue Inflammatory Factors and TLR2/NF- κ B/Myd88 Pathway in Renal Fibrosis Model Rats

SUN Xiangbo^{1,2}, LI Yongwei¹, SUN Hong¹, WANG Song¹, LI Wei²

(1. Qingdao Haici Medical Group, Qingdao 266000; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effects and its possible mechanism of *Heidi Huang Pills* (黑地黄丸) on the microinflammation of renal tissue in rats with renal fibrosis. **Methods** A total of 50 Wistar rats were randomly divided into a normal group, a model group and a *Heidi Huang Pills* high, middle and low dose groups, with 10 rats in each group. Except the normal group, the rats were performed 5/6 nephrectomy to establish a renal fibrosis model. From the day after surgery, rats in the high, middle and low dose groups of *Heidi Huang Pills* were given intragastric administration of drug solution respectively containing 2, 1, 0.5 g/ml crude drug with 10 ml/kg, and the model group as well as the normal group were given the same volume of normal saline, once a day, continuous administration for 60 days. The levels of serum creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were measured in each group. The pathological changes of renal tissue were observed by HE staining. Immunohistochemistry and western blot were used to detect the expression of Toll-like receptor 2 (TLR₂), nuclear factor κ B (NF- κ B) and myeloid differentiation factor 88 (Myd88) in renal tissues. Immunohistochemistry was used to detect the expression of inflammatory factor including tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) in renal tissue. **Results** Compared with the normal group, the levels of serum Cr, BUN and hs-CRP in the model group were significantly increased, and the expressions of TLR₂, NF- κ B, Myd88, TNF- α and IL-6 in renal tissues were also increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum levels of Cr, BUN and hs-CRP in the high, middle and low dose of *Heidi Huang Pills* groups were significantly decreased, and the expressions of TLR₂, NF- κ B, Myd88, TNF- α and IL-6 in renal tissues were also decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the indexes of the high, middle and low dose of *Heidi Huang Pills* groups ($P > 0.05$). HE staining showed that the glomerular deformation, tubulointerstitial widening and inflammatory cell infiltration in the model group, while renal interstitial edema, glomerular sclerosis, and tubular atrophy and inflammatory cell infiltration in the high, middle and low dose of *Heidi Huang Pills* groups were alleviated compared with the model group, and the difference among different dose groups was not significant. **Conclusion** *Heidi Huang Pills* can significantly improve the microinflammation of renal tissue in renal fibrosis rats, and its mechanism may be related to the regulation of TLR₂/NF- κ B/Myd88 pathway in renal tissue.

Keywords *Heidi Huang Pills*; renal fibrosis; inflammatory factor; Toll-like receptor 2; myeloid differentiation factor 88; nuclear transcription factor κ B

(收稿日期: 2019-01-06; 修回日期: 2019-05-13)

编辑: 邓 媛