

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.18.015

肾络通对肾间质纤维化模型小鼠肾小管上皮细胞表型转化的影响

孙东云^{1,2}, 王箬^{2,3}, 王香婷^{2,3}, 王聪慧¹, 王淼¹, 梁丽娟¹, 许庆友^{1,2,3*}

(1. 河北医科大学研究生院, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017; 2. 河北中医学院中西医结合学院; 3. 河北省中西医结合肝病重点实验室)

摘要 **目的** 探讨肾络通治疗肾间质纤维化的可能作用机制。 **方法** 纯系 C57BL/6J 野生小鼠 (WT) 及肾上腺髓质素基因敲除杂合子小鼠 (AMKO) 随机分为假手术组、模型组、依普利酮组及肾络通组, 每组 5 只。除假手术组外, 其余各组结扎左侧输尿管复制肾间质纤维化小鼠模型。依普利酮组给予依普利酮 100 mg/(kg·d) 加入饲料喂养, 肾络通组给予肾络通溶液 26 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组和模型组给予蒸馏水 0.3 ml 灌胃, 共 10 天。HE、Masson 染色观察各组小鼠梗阻侧肾组织病理改变; 免疫组化法及 Western Blot 法检测肾组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、肾上腺髓质素 (ADM) 的表达; 检测血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 水平。 **结果** WT 及 AMKO 小鼠各组血 Scr 和 BUN 含量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。肾脏病理结果显示, 模型组肾小管扩张、上皮细胞坏死, 肾间质大量炎性细胞浸润, 胶原组织沉积显著增多, 依普利酮组和肾络通组可明显抑制间质炎性细胞浸润及胶原沉积。与本鼠种假手术组比较, WT 模型组和 AMKO 模型组 α -SMA、TGF- β_1 表达明显升高, 而 ADM 表达明显降低 ($P < 0.01$)。与本鼠种模型组比较, 依普利酮组和肾络通组 α -SMA、TGF- β_1 表达明显降低, 而 ADM 表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。两鼠种之间比较, AMKO 假手术组、模型组、依普利酮组、肾络通组 ADM 表达均低于相应的 WT 小鼠组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 肾络通可能通过上调 ADM 表达, 降低 α -SMA、TGF- β_1 表达, 从而抑制肾小管上皮细胞表型转化, 减轻了肾脏病理损伤。

关键词 肾间质纤维化; 肾络通; 肾小管上皮细胞表型转化; α -平滑肌肌动蛋白; 转化生长因子- β_1 ; 肾上腺髓质素

慢性肾脏病是临床常见病, 其病变通常逐渐进展为肾小球硬化和肾间质纤维化。研究已证实, 肾功能与肾间质纤维化程度的相关性较肾小球硬化更为密切^[1]。肾间质纤维化的形成与多种因素有关, 其中肾小管上皮细胞表型转化发挥着关键作用^[2]。近年来对体内抑制纤维化的自身物质进行研究, 其中肾上腺髓质素 (ADM) 显示出拮抗器官纤维化的作用^[3-4]。本研究采用野生小鼠与肾上腺髓质素基因敲除 (AMKO + / -) 小鼠结扎单侧输尿管方式复制肾间质纤维化模型, 采用化瘀涤痰通络中药肾络通进行干预, 以新型醛固酮受体阻断剂依普利酮作为对照药物, 观察小鼠肾组织中 α -平滑肌肌

动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 及 ADM 的表达情况, 初步探讨肾络通拮抗肾间质纤维化的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性 C57BL/6JSPF 级纯系野生小鼠 (WT) 20 只, 8 周龄, 体质量 (20 ± 3) g, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2009-0004, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供; 肾上腺髓质素基因敲除杂合子 (+ / -) 小鼠 (AMKO) 20 只, 雌性, SPF 级, 体重 17 ~ 22 g, 8 周龄, 由东京大学提供。

1.2 药物

肾络通组: 黄芪 15 g, 丹参 10 g, 地龙 9 g, 僵蚕 10 g, 乌梢蛇 10 g, 茯苓 10 g, 大黄 6 g, 由河北省中医院制成水煎液含生药 2 g/ml。依普利酮饲

基金项目: 国家自然科学基金 (81273684, 81473652); 河北省自然科学基金 (C2011206042, H2015423009)

* 通讯作者: qingyouxu@sohu.com (0311) 89926298

料,由辉瑞公司提供原粉,由日本 Research Diets. Inc 公司按 1.25 g/kg 加入饲料中,折合 100 mg/(kg·d)。

1.3 主要试剂与仪器

血肌酐测定试剂盒(批号:20090831)、尿素氮测定试剂盒(批号:20090826)均由南京建成生物工程研究所提供;免疫组化试剂盒(批号:15155A10)由北京中杉金桥生物技术有限公司提供; α -SMA 抗体(Abcam 公司,批号:P68032);ADM 抗体(Abcam 公司,批号:GR98655-1);TGF- β_1 抗体(Bioworld 公司,批号:AA56133); β -actin(Affbiotech 公司,批号:19U71)。转膜仪(SEMI-DRY Transfer Cell system,美国 Bio-Rad 公司),凝胶图象分析系统(Scion Image 4.0.3.2 图象分析系统,美国国立卫生研究院研发)。

1.4 动物模型制备

实验小鼠经适应性喂养 1 周后,参照文献[6]采用单侧输尿管结扎方法建立肾间质纤维化模型。乙醚麻醉后于腹部左侧切开,游离左侧输尿管,分别在输尿管上 1/3 及下 1/3 处用丝线结扎后,切断输尿管,逐层缝合腹部皮肤。假手术组仅游离左侧输尿管但不结扎,轻轻拨动肠管后缝合腹部皮肤。

1.5 分组及给药

WT 小鼠及 AMKO 小鼠按照体重编号,根据随机数字表分别分为假手术组、模型组、依普利酮组、肾络通组,每组各 5 只。造模当日开始依普利酮组按 100 mg/(kg·d) 加入饲料喂养,肾络通组按 26 g/(kg·d) 灌胃,假手术组和模型组给予蒸馏水 0.3 ml 灌胃,共 10 天。

1.6 观察指标与方法

摘取小鼠左侧肾脏,以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,用 3 μ m 的石蜡切片行 HE、Masson 染色测定,光学显微镜下观察肾组织病理改变;测定血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)含量;免疫组化及 Western blot 法检测 α -SMA、TGF- β_1 、ADM 表达。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件,数据资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠血 Scr 和 BUN 含量比较

表 1 示,WT 及 AMKO 小鼠各组血 Scr 和 BUN

含量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。两种小鼠组间比较,差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠血 Scr 和 BUN 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Scr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)
WT 假手术组	5	76.34 $\pm$ 12.13	5.53 $\pm$ 2.06
WT 模型组	5	81.43 $\pm$ 14.46	6.17 $\pm$ 2.28
WT 依普利酮组	5	79.35 $\pm$ 16.96	5.42 $\pm$ 1.47
WT 肾络通组	5	76.60 $\pm$ 17.25	5.34 $\pm$ 2.26
AMKO 假手术组	5	77.78 $\pm$ 15.67	6.12 $\pm$ 2.06
AMKO 模型组	5	79.35 $\pm$ 11.26	6.35 $\pm$ 2.15
AMKO 依普利酮组	5	78.25 $\pm$ 15.33	5.22 $\pm$ 2.12
AMKO 肾络通组	5	76.34 $\pm$ 16.32	5.63 $\pm$ 1.78

注:WT,野生小鼠;AMKO,肾上腺髓质素基因敲除小鼠;Scr,血肌酐;BUN,尿素氮

2.2 各组小鼠肾组织形态学比较

假手术组 HE 染色未见显著异常,模型组可见肾小管扩张,上皮细胞水肿、坏死、脱落,肾间质区大量炎性细胞浸润,且 AMKO 小鼠较严重;依普利酮组及肾络通组肾间质区炎性细胞浸润较模型组减轻。Masson 染色显示,假手术组少量胶原成分,模型组肾间质胶原沉积显著增多,并呈条带状或灶状分布,且 AMKO 小鼠较严重;依普利酮组及肾络通组肾间质胶原沉积较模型组显著减少。

2.3 各组小鼠肾组织 α -SMA、TGF- β_1 、ADM 表达比较

免疫组化检测显示,假手术组肾组织中 α -SMA 仅在血管表达,TGF- β_1 主要表达于肾小管上皮细胞胞浆,呈弱表达。而两种小鼠在模型组中表达明显增强,可见于肾小管上皮细胞,且 AMKO 小鼠较 WT 小鼠更为显著。依普利酮组及肾络通组较模型组表达减弱,但 AMKO 小鼠较 WT 小鼠表达增强。Western blot 结果显示, α -SMA 及 TGF- β_1 在模型组明显上调并被依普利酮及肾络通抑制,但 WT 小鼠与 AMKO 小鼠有显著性差异。免疫组化检测 ADM 表达:WT 假手术组 ADM 表达较为广泛,在皮质及髓质均有表达,且以髓质表达较为显著;AMKO 假手术组 ADM 表达明显减弱;两模型组 ADM 表达显著减少,且 AMKO 小鼠尤为明显;依普利酮及肾络通组表达较模型组增多,其中 WT 小鼠表达显著。Western blot 检测结果显示同样结果。

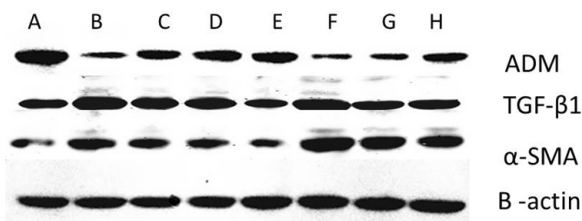
表 2 示,与本鼠种假手术组比较,WT 模型组和 AMKO 模型组 α -SMA、TGF- β_1 表达明显升高,而 ADM 表达明显降低($P < 0.01$)。与本鼠种模型组比较,依普利酮组和肾络通组 α -SMA、TGF- β_1 表达明显降低,而 ADM 表达明显升高($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠肾脏 α -SMA、TGF- β_1 、ADM 表达比较 (/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	α -SMA	TGF- β_1	ADM
WT 假手术组	5	0.14 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.07	1.26 $\pm$ 0.12
WT 模型组	5	0.76 $\pm$ 0.12 [*]	0.96 $\pm$ 0.33 [*]	0.23 $\pm$ 0.06 [*]
WT 依普利酮组	5	0.40 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	0.42 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$	0.35 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$
WT 肾络通组	5	0.38 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$	0.41 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	0.47 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta\blacktriangle$
AMKO 假手术组	5	0.16 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.10	0.56 $\pm$ 0.14 [#]
AMKO 模型组	5	1.23 $\pm$ 0.16 [*] #	1.23 $\pm$ 0.42 [*]	0.13 $\pm$ 0.03 [*] #
AMKO 依普利酮组	5	0.62 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$ #	0.73 $\pm$ 0.20 Δ #	0.28 $\pm$ 0.06 Δ #
AMKO 肾络通组	5	0.59 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$ #	0.69 $\pm$ 0.17 Δ #	0.32 $\pm$ 0.06 Δ ##

注: WT, 野生小鼠; AMKO, 肾上腺髓质素基因敲除小鼠; α -SMA, α -平滑肌肌动蛋白; TGF- β_1 , 转化生长因子- β_1 ; ADM, 肾上腺髓质素; 与本鼠种假手术组比较, * $P < 0.01$; 与本鼠种模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与本鼠种依普利酮组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 WT 相应组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

或 $P < 0.01$), 并且 WT 肾络通组 ADM 表达较 WT 依普利酮组升高更明显 ($P < 0.05$)。两鼠种之间比较, AMKO 模型组、依普利酮组、肾络通组 α -SMA 表达明显高于相应的 WT 小鼠组, AMKO 依普利酮组、肾络通组 TGF- β_1 表达亦高于相应的 WT 小鼠组, AMKO 假手术组、模型组、依普利酮组、肾络通组 ADM 表达均低于相应的 WT 小鼠组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注: A: WT 假手术组; B: WT 模型组; C: WT 依普利酮组; D: WT 肾络通组; E: AMKO 假手术组; F: AMKO 模型组; G: AMKO 依普利酮组; H: AMKO 肾络通组; ADM, 肾上腺髓质素; TGF- β_1 , 转化生长因子- β_1 ; α -SMA, α -平滑肌肌动蛋白

图 1 各组小鼠肾脏 α -SMA、TGF- β_1 、ADM 表达电泳图

3 讨论

肾小管上皮细胞表型转化是指肾小管上皮细胞失去其原有特征而获得肌成纤维细胞特征的现象, 在慢性肾脏疾病进展中具有重要作用, 其标志物为 α -SMA。研究显示, 系膜增殖性肾小球肾炎、增殖硬化性肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎、狼疮性肾炎及 IgA 肾病等均能观察到细胞表型转化的病理过程; 5/6 肾切除、单侧输尿管接扎、阿霉素注射、腺嘌呤灌胃以及环孢素 A 等导致的动物肾脏损伤中亦可见到肾小管上皮细胞的转分化现象^[9]。肾小管上皮细胞表型转化可由多种因素诱导而成, 体外血管紧张素 II (AngII)、TGF- β_1 、白细胞介素 1

(IL-1)、氧化低密度脂蛋白内皮受体 (LOX-1)、高糖、胰岛素样生长因子、马兜铃酸、压力等因素均可诱导人类、大鼠及猪肾小管上皮细胞表型转化的发生, 其中 TGF- β_1 发挥着关键作用^[9]。ADM 是日本学者 Kitamura 1993 年从嗜铬细胞瘤中分离成功的一种生物活性多肽^[7], 具有拮抗 TGF- β_1 、Ang II 和抗氧化、抗炎等多种生理作用, 并可拮抗多种脏器纤维化^[8-10]。肾脏是 ADM 表达及分布较多的器官之一, ADM 与肾脏功能密切相关, 对多种原因引起的肾损伤有保护作用^[8-10]。

本研究采用 ADM 基因敲除小鼠, 经单侧输尿管结扎方法复制肾间质纤维化模型, 以观察 ADM 发挥的作用, 同时探讨中药肾络通的可能作用靶点。研究结果显示, AMKO 各组小鼠的肾脏病理损伤更为明显, 其模型组肾小管间质大量炎性细胞聚集, 胶原沉积明显增多, 促纤维化因子 TGF- β_1 表达增强, 细胞表型转化标志物 α -SMA 呈强阳性表达, 纤维化程度加重。WT 小鼠模型组 TGF- β_1 及 α -SMA 表达虽较假手术组为重, 但与 AMKO 小鼠相比, 损伤程度明显减轻。结果提示当 ADM 部分缺失 (+/-) 时, 其抗炎、抗氧化应激、抑制促纤维化因子作用减弱, 细胞增殖和细胞表型转化明显增强。

中医学认为, 多种原因诱导发生的肾小管上皮细胞表型转化, 促进形成肾间质纤维化, 属于中医学中的“血瘀痰阻”, 亦称“微型癥瘕”。其病机为脾肾两虚、瘀血阻滞、水湿停聚、浊毒壅塞, 是痰瘀阻于肾络所致。肾络通是河北中医学院赵玉庸教授依据多年临床经验总结的经验方, 以肾络瘀阻为病机, 以益气活血、化痰涤瘀通络为治法。方中黄芪益气补虚以扶正, 丹参活血, 地龙、乌梢蛇、僵蚕化痰涤瘀, 大黄活血解毒, 茯苓健脾利水消

肿。前期研究证实,肾络通可减少血管活性物质的分泌、抑制氧化应激及细胞凋亡、减少细胞外基质沉积、改善肾功能、延缓肾间质纤维化的进展,对系膜增生性肾小球肾炎、IgA 肾病等均有满意疗效^[1-13]。本研究结果显示,经肾络通干预的各组实验小鼠 ADM 表达上调, TGF- β_1 及 α -SMA 表达下降,肾间质胶原沉积减少,肾脏病理损害减轻,且 WT 较 AMKO 小鼠更为明显。本研究还观察了各组小鼠肾功能的变化,而肾功能均有轻度改变,但无明显统计学差异,这可能与实验周期短,对侧肾脏发挥代偿作用有关。本研究中采用新型醛固酮受体阻断剂依普利酮作为对照药物,结果显示依普利酮亦可以减轻炎性细胞浸润,抑制细胞的表型转化,且对 WT 小鼠的作用较 AMKO 小鼠更为明显。比较依普利酮与中药肾络通的治疗效果,结果显示两者在抑制 TGF- β_1 及 α -SMA 表达上无明显差异。总之,肾络通可能通过上调 ADM 的表达,降低 α -SMA、TGF- β_1 表达,从而抑制肾小管上皮细胞表型转化,减轻了肾脏病理损伤。

参考文献

- [1] CAMPBELL RC, RUGGENENTI P, REMUZZI G. Halting the progression of chronic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(Supp 13): S190-S195.
- [2] ZEISBERG EM, POTENTA SE, SUGIMOTO H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2282-2287.
- [3] YAMAMOTO C, FUKUDA N, JUMABAY M. Protective effects of statin on cardiac fibrosis and apoptosis in adrenomedullin-knockout mice treated with angiotensin II and high salt loading [J]. Hypertens Res, 2010, 16(6): 243-246.
- [4] SHIMOSAWA T, MATSUI T, LIU J, et al. Adrenomedullin and oxidative stress in vascular damages and metabolic disease [J]. Curr Hypertens Rev, 2011, 7(4): 251-256.
- [5] WANG R, DING G, LIANG W. Role of LOX-1 and ROS in oxidized low-density lipoprotein induced epithelial-mesenchymal transition of NRK52E [J]. Lipids Health Dis, 2010, 19(9): 120-127.
- [6] 王玉,李晓玫,邹万忠,等. 人类肾小球肾炎中肾小管及间质细胞表型转化的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(2): 7-40.
- [7] KITAMURA K, KANGAWA K, KAWAMOTO M, et al. Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 192(2): 553-560.
- [8] OYAR EÖ, KIRIŞ I, GÜLMEN S, et al. The protective effect of adrenomedullin on renal injury, in a model of abdominal aorta cross-clamping [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 60(1): 5-40.
- [9] GOLDFARB-RUMYANTZEV AS, ALPER SL. Short-term responses of the kidney to high altitude in mountain climbers [J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 29(3): 487-506.
- [10] SENDESKI MM, PERSSON AB, LIU ZZ, et al. Iodinated contrast media cause endothelial damage leading to vasoconstriction of human and rat vasa recta [J]. 2012, 303(12): F1592-F1598.
- [11] 王蕊,王箐,梁丽娟,等. 肾络通对梗阻性肾病氧化应激和细胞凋亡的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(9): 778-781.
- [12] 王月华,董绍英,许庆友,等. 赵玉庸辨治慢性肾功能衰竭经验 [J]. 中医杂志, 2011, 52(12): 1000-1001.
- [13] 王亚利,赵玉庸,侯仙明,等. 肾络通药物血清对血管紧张素诱导体外大鼠系膜细胞 ECM 分泌和 CTGF mRNA 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(10): 678-680.

Impact of Shenluotong (肾络通) on Phenotypic Transformation of Renal Tubular Epithelial Cells in Renal Interstitial Fibrosis Model Mice

SUN Dongyun^{1,2}, WANG Zheng^{2,3}, WANG Xiangting^{2,3}, WANG Conghui¹, WANG Miao¹, LIANG Lijuan¹, XU Qingyou^{1,2,3}

(1. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050017; 2. College of Integration of Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine; 3. Integration of Chinese and Western Medicine Liver and Kidney Diseases Key Laboratory of Hebei Province)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Shenluotong* in treating renal interstitial fibrosis. **Methods** Pure strain of wild mice of C57BL/6J (WT) and heterozygous mice with adrenal medulla gene knockout (AMKO) were randomized into a sham operation group, a model group, an eplerenone group and a *Shenluotong* group, with 5 mice in each group. Mice in each group were taken left ureter ligation to establish renal interstitial fibrosis mice models except those in the sham operation group. The eplerenone group was fed with fodder added with

100 mg/ (kg · d) of eplerenone, the Shenluotong group was given 26 g/ (kg · d) of *Shenluotong* solution by gavage, the sham operation group and the model group were given 0. 3 ml of distilled water by gavage, all for 10 days. Pathological changes of renal tissue of obstructive side in all groups were examined with hematoxylin and eosin (HE) stain and Masson stain. The expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) , transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and adrenomedulin (ADM) in renal tissue were detected with immunohistochemical method and Western Blot method. The level of serum creatinine (Scr) and blood urine nitrogen (BUN) were detected. **Results** There was no significant difference in levels of Scr and BUN in WT and AMKO mice between all groups ($P > 0. 05$) . Renal pathologic findings showed that there was tubular ectasia, epithelial cell necrosis and a large number of inflammatory cell infiltration in renal interstitial, and that collagen deposition increased significantly in the model group. Inflammatory cell infiltration in renal interstitial and collagen deposition was inhibited in the eplerenone group and the Shenluotong group. Compared with the same mice species in the sham operation group, the expression levels of α -SMA and TGF- β 1 increased, while the expression level of ADM decreased in the WT model group and the AMKO model group ($P < 0. 01$) . Compared with the same mice species in the model group, the expression levels of α -SMA and TGF- β 1 decreased, while the expression level of ADM increased in the eplerenone group and the Shenluotong group ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$) . Compared with two types of mice, the expression level of ADM in AMKO mice in the sham operation group, the model group, the eplerenone group and the Shenluotong group was lower than that in WT mice in corresponding groups ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$) . **Conclusion** *Shenluotong* might up-regulate the expression level of ADM and down-regulate the expression levels of α -SMA and TGF- β 1 to inhibit phenotypic transformation of renal tubular epithelial cells and reduce renal pathological injury.

Keywords renal interstitial fibrosis; *Shenluotong*; phenotypic transformation of renal tubular epithelial cell; α -smooth muscle actin; transforming growth factor- β 1; adrenomedulin

(收稿日期: 2016 - 03 - 10; 修回日期: 2016 - 05 - 09)

编辑: 邓 媛