

◆方药研究◆

清化固肾排毒颗粒对单侧输尿管梗阻大鼠 肾组织 TGF- β 1 和 α -SMA 表达的影响

汪国敏^{1,2}, 李丽燕², 吴小燕^{1,2}, 林文博^{1,2}, 冯雨林^{1,2}, 董飞侠^{1,2}

1. 浙江中医药大学附属温州中医院, 浙江 温州 325000

2. 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江 杭州 310000

[摘要] 目的: 观察清化固肾排毒颗粒对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达的影响, 探讨其抗肾纤维化的作用机制。方法: 72 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、洛丁新组及清化固肾排毒颗粒组, 除假手术组外, 其余各组大鼠均采用单侧输尿管结扎手术方法 (UUO) 建立肾纤维化梗阻大鼠模型, 术后各组分别予相应药物或生理盐水灌胃, 每天 1 次。第 7、14、21 天, 各组大鼠禁食不禁水 1 天, 处死, 取肾组织做病理检测, HE 染色观察其病理变化, 免疫组织化学染色检测 TGF- β 1 和 α -SMA 在肾间质的阳性染色表达。结果: 与假手术组比较, 干预第 7、14、21 天, 模型组、洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾小管间质损伤指数显著增加, 肾组织 TGF- β 1 和 α -SMA 的表达均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 干预第 7、14、21 天, 洛丁新组和清化固肾排毒颗粒组大鼠肾小管间质损伤指数明显减轻, 肾组织 TGF- β 1 和 α -SMA 的表达均明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 清化固肾排毒颗粒可能通过下调 TGF- β 1 和 α -SMA 的表达来抑制上皮细胞间充质转化和细胞外基质的过度积聚, 实现改善肾间质纤维化的作用。

[关键词] 输尿管梗阻; 肾纤维化; 清化固肾排毒颗粒; 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1); α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R693 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2018) 01-0001-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.01.001

Qinghua Gushen Paidu Granules Has Effect on TGF- β 1 and α -SMA Expression of Nephridial Tissue of Rat with Unilateral Ureteral Obstruction

WANG Guomin, LI Liyan, WU Xiaoyan, LIN Wenbo, FENG Yulin, DONG Feixia

Abstract: Objective: To observe the effect of Qinghua Gushen Paidu granules on expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) of nephridial tissue of rats with unilateral ureteral obstruction, and investigate its mechanism of anti-renal fibrosis. Methods: Divided 72 SD rats of SPF grade into sham group, model group, Lotensin group, and Qinghua Gushen Paidu granules group randomly. In addition to the sham group, all groups were given unilateral ureteral occlusion (UUO) to establish rat models of renal fibrosis obstruction and respectively received medication or saline by gavage after surgery, once a day. On the 7th, 14th, and 21st day of treatment, rats in each group fasted for one day without water-fasting and were sacrificed. Then kidney tissue of the rats were collected for pathology test. Observed pathological changes by using HE staining, and detected positive staining expression of TGF- β 1 and α -SMA in renal interstitium by immunohistochemical staining. Results: Compared with the sham group, on the 7th, 14th, and 21st day of intervention, the damage indexes of renal tubular interstitium in other groups were evidently improved, and the expression of TGF- β 1 and α -SMA of kidney tissue was also obviously increased, differences being significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, on the 7th, 14th, and 21st day of intervention, the damage indexes of renal tubular interstitium and the

[收稿日期] 2017-06-13

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目 (LY14H270001); 浙江省中医药科学研究基金项目 (2013ZB121)

[作者简介] 汪国敏 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肾脏疾病的研究。

[通信作者] 董飞侠, E-mail: cgrsfhtd@163.com。

expression of TGF- β 1 and α -SMA of renal tissue in the Lotensin group and Qinghua Gushen Paidu granules group were evidently decreased, differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qinghua Gushen Paidu granules may prevent the mesenchymal transition in epithelial cells and excessive accumulation of matrix out of epithelial cells by reducing the expression of TGF- β 1 and α -SMA so as to improve renal fibrosis.

Keywords: Ureteral obstruction; Renal fibrosis; Qinghua Gushen Paidu granules; Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1); α -smooth muscle actin (α -SMA); Animal experiment; Rats

肾纤维化是各种慢性肾脏病进展导致肾功能衰竭的病理过程,肾纤维化包括肾小球硬化和肾小管间质纤维化,而肾小管间质纤维化与慢性肾脏病的预后密切相关,延缓肾间质纤维化的程度成为慢性肾脏病防治的关键。单侧输尿管梗阻(UUO)模型是目前对肾纤维化研究比较成熟的一种实验动物模型,单侧输尿管梗阻后尿路压力逐渐增高,肾脏血流量减少,静脉引流堵塞,出现巨噬细胞浸润,纤维细胞增殖,形成疤痕,从而导致肾间质纤维化产生,最终使肾功能衰竭。清化固肾排毒方由黄芪、山药、柴胡、白花蛇舌草、金钱草、大黄等中药组成,针对慢性肾脏病脾肾亏虚为本、水湿痰浊瘀血为标的病机,治以益气活血化痰,利湿化痰祛浊,治疗慢性肾脏病有较好的疗效^[1-2]。本研究清化固肾排毒颗粒对 UUO 大鼠肾组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响,探讨其抗肾间质纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 72 只, SPF 级, 体质量(180 ± 20)g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物许可证号: SCXK(沪)2015-0009, 于温州医科大学实验动物中心饲养, 每笼 6 只, 人工光照, 阴暗各 12 h, 室温 $20 \sim 24^\circ\text{C}$, 空气相对湿度 (50 ± 10)%, 自由饮食。适应性喂养 1 周。

1.2 实验药物 清化固肾排毒颗粒(批号: 20141207, 江阴天江药业有限公司, 药物组成: 黄芪、山药、柴胡、白花蛇舌草、金钱草、大黄、白芥子); 洛丁新(批号: 12294563, 盐酸贝那普利片, 北京诺华制药有限公司)。

1.3 主要试剂和仪器 抗 TGF- β 1 抗体(编号 ab92486, 英国 Abcam 公司); 抗 α -SMA 抗体(编号 ab5694, 英国 Abcam 公司); 一抗稀释液(北京索莱宝生物科技公司); HE 试剂盒(碧云天生物技术研究所); PBS、柠檬酸缓冲液、浓缩型 DAB 试剂盒、超敏二

步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥公司)。超低温冰箱(DW-86L626), 中国海尔公司; 切片机(RM2235), 德国 Leica 公司; 组织脱水机(KD-TS3A), 郑州南北仪器设备有限公司; 光学显微镜(BX51), 日本 Olympus 公司; 凝胶图像分析系统(Biosen SC300), 上海山富科学仪器有限公司。

1.4 实验分组及大鼠模型制备 72 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组, 每组 18 只。模型组、洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠以 10 %的水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉后取右侧卧位固定, 局部剃毛, 从背部距左侧脊肋角 1.5 cm 做一斜向切口, 逐层切开皮肤、肌肉等组织, 开腹, 暴露左侧肾脏, 游离肾脏及左侧输尿管, 分别于约肾盂处和输尿管上段处双重结扎且不剪断, 回纳肾脏归于原位后逐层缝合切口。假手术组开腹后只分离左侧输尿管, 不结扎, 其余步骤同上。

1.5 给药 假手术组、模型组予生理盐水 10 mL/(kg·d)灌胃, 洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组灌胃相应浓度的药物溶液。清化固肾排毒颗粒组按相当于 60 kg 体质量成人每天剂量的 10 倍给药(成人每天剂量 9 g), 给药剂量为 1.5 g/(kg·d); 洛丁新组予洛丁新, 给药剂量为 1.6 mg/(kg·d)。

1.6 取材 各组大鼠分别于给药后第 7、14、21 天, 随机取出 6 只, 禁食不禁水 1 天, 处死, 留取梗阻侧肾脏, 除去包膜, 放出积水, 迅速分切肾组织, 将其中一份于 4%多聚甲醛溶液中固定, 其余组织生理盐水冲洗后迅速置于液氮中冻存, 转置 -80°C 冰箱中保存。

1.7 病理观察 各组大鼠肾组织石蜡包埋切片后, 肾脏组织常规染色观察, 取经 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 的肾脏组织标本, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 制成 $3 \mu\text{m}$ 石蜡切片, 按常规方法进行 HE 染色。HE 染色评定: 光学显微镜观察($\times 400$ 倍), 依据每个

视野肾小管病变(肾小管上皮细胞空泡变性、肾小管扩张、肾小管萎缩、红细胞管型、蛋白管型、间质水肿、间质纤维化、间质炎性细胞浸润等)累及的小管数目评定肾小管间质损伤指数。0分:肾小管结构正常,未见病变;1分:肾小管病变数目<3个;2分:肾小管病变数目3~5个;3分:肾小管病变数目>5个或肾小管结构消失。每张切片随机选取10个视野不相重叠的皮质处肾小管,每只大鼠选5张组织切片,最后取平均值。

1.8 免疫组化 3 μm石蜡切片常规脱蜡水化,柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中高压煮沸修复抗原,加3% H₂O₂孵育20 min(室温);滴加山羊血清封闭液(室温封闭30 min),滴加一抗,抗TGF-β1(1:200)、α-SMA(1:200),4℃过夜。加使用聚合HRP标记的二抗(37℃、20 min),DAB显色、蒸馏水洗涤、苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。在400倍光镜下观察,其中棕黄色部分为阳性染色。避开边缘及组织,每张切片随机选取6个非重叠视野,使用Image Pro Plus 6.0软件对图像进行分析,分析每张照片中阳性染色面积占视野总面积的比值,取平均值作为该切片的阳性面积进行统计分析。

1.9 统计学方法 采用SPSS23.0统计软件处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)对多个样本均数进行比较,两两之间多重比较,方差齐采用LSD检验,方差不齐时采用Dunnett T₃检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏组织病理结果比较 见图1、表1。①HE染色组织形态观察:假手术组肾小球结构完整,肾小管排列紧密,间质中未见明显炎症细胞浸润。模型组可见部分肾小管上皮细胞弥漫性空泡变性,管腔扩张,肾小管上皮细胞萎缩、坏死,肾间质出现成纤维细胞增生和肾间质纤维化,随梗阻时间延长,情况进一步加重,在第21天时上述变化最为显著。洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾小管损伤程度较模型组明显减轻,可见部分结构完整的肾小管,肾间质炎症细胞浸润减少。②肾小管间质损伤指数比较:与假手术组比较,干预第7、14、21天,模型组、洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾小管间质损伤指数显著增加($P < 0.05$),且随梗阻时间延长,损伤指数逐渐增加。与模型组比较,干预第7、14、

21天,洛丁新组和清化固肾排毒颗粒组大鼠肾小管间质损伤指数明显减轻($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠肾小管间质损伤指数比较($\bar{x} \pm s, n=6$) 分

组别	7d	14d	21d
假手术组	0.12±0.33	0.26±0.44	0.34±0.52
模型组	2.14±0.53 ^①	2.54±0.54 ^①	2.80±0.40 ^①
洛丁新组	1.50±0.51 ^{①②}	1.76±0.52 ^{①②}	2.46±0.65 ^{①②}
清化固肾排毒颗粒组	1.68±0.47 ^{①②}	1.90±0.36 ^{①②}	2.28±0.57 ^{①②}

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠各时段肾组织TGF-β1表达比较 见图2、表2。假手术组大鼠肾组织可见TGF-β1在肾间质呈少量棕黄色阳性表达,模型组中TGF-β1在肾间质呈大量棕黄色阳性表达,洛丁新组和清化固肾排毒颗粒组中TGF-β1在肾间质呈中等量棕黄色阳性表达。与假手术组比较,干预第7、14、21天,模型组、洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾组织TGF-β1表达均明显升高($P < 0.05$),且呈持续升高趋势,在21天时TGF-β1表达最为显著。与模型组比较,干预第7、14、21天,洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾组织TGF-β1表达均明显降低($P < 0.05$)。干预第7、14、21天,洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组比较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠各时段肾组织TGF-β1表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$) %

组别	7d	14d	21d
假手术组	0.02±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
模型组	0.23±0.03 ^①	0.35±0.05 ^①	0.59±0.06 ^①
洛丁新组	0.10±0.05 ^{①②}	0.18±0.05 ^{①②}	0.30±0.03 ^{①②}
清化固肾排毒颗粒组	0.14±0.01 ^{①②}	0.20±0.05 ^{①②}	0.29±0.01 ^{①②}

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠各时段肾组织α-SMA表达比较 见图3、表3。假手术组大鼠肾组织中可见α-SMA在肾间质呈微量棕黄色阳性表达,模型组中α-SMA在肾间质呈大量棕黄色阳性表达,洛丁新组和清化固肾排毒颗粒组中α-SMA在肾间质呈中等量棕黄色阳性表达。与假手术组比较,干预第7、14、21天,模型组、洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾组织α-SMA表达均明显升高($P < 0.05$),且呈持续升高趋势,在21天时α-SMA表达最为显著。与模型组比较,干预第7、14、21天,洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组大鼠肾组织α-SMA表达均明显降低($P <$

0.05)。干预第7、14、21天，洛丁新组、清化固肾排毒颗粒组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。

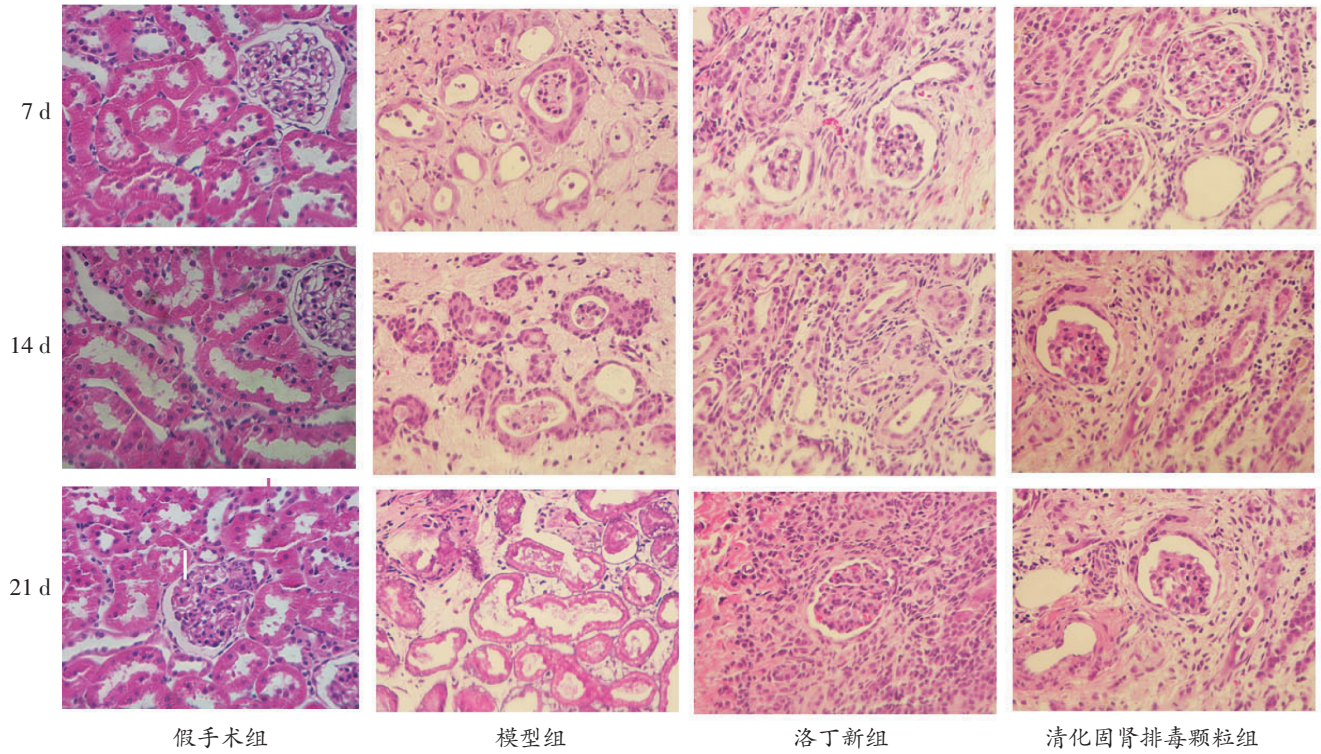


图1 各组大鼠不同时段肾纤维化情况 (HE染色, ×400)

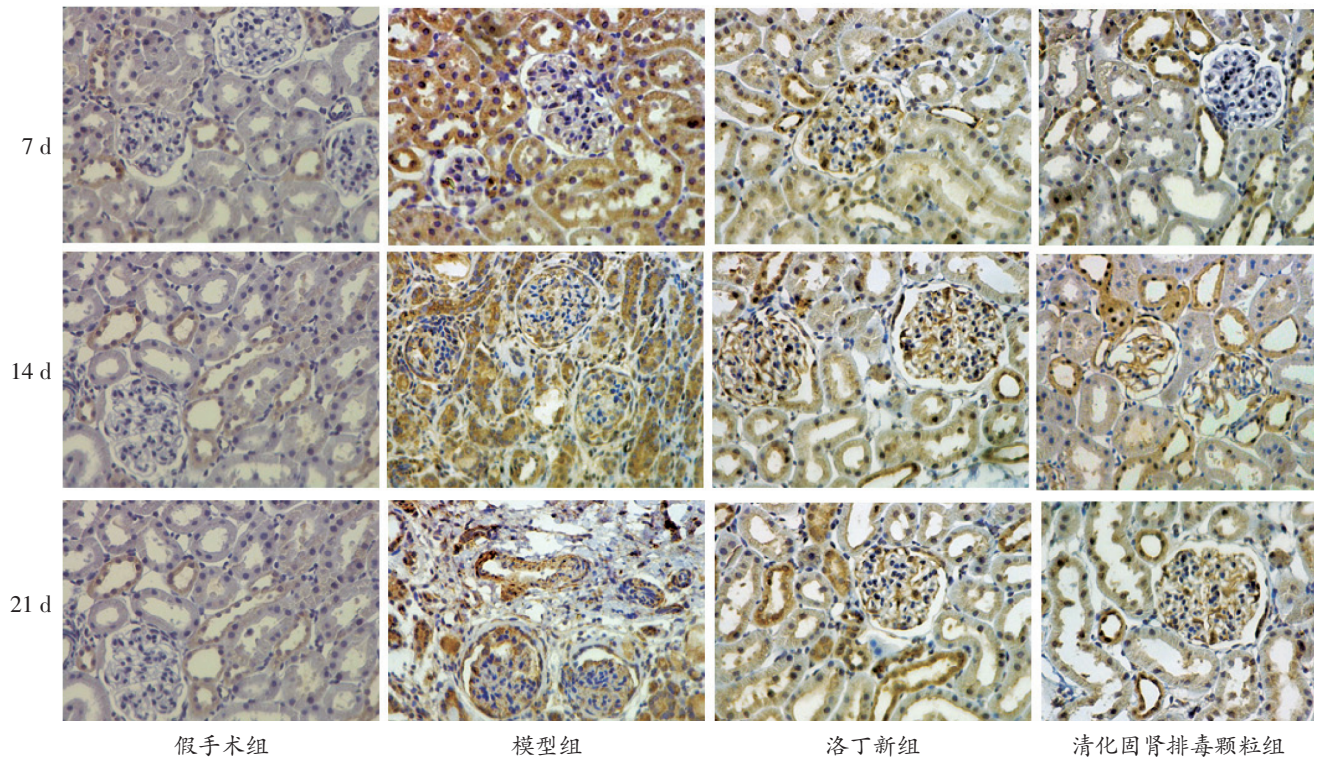


图2 各组大鼠不同时段肾组织 TGF-β1 表达 (免疫组化染色, ×400)

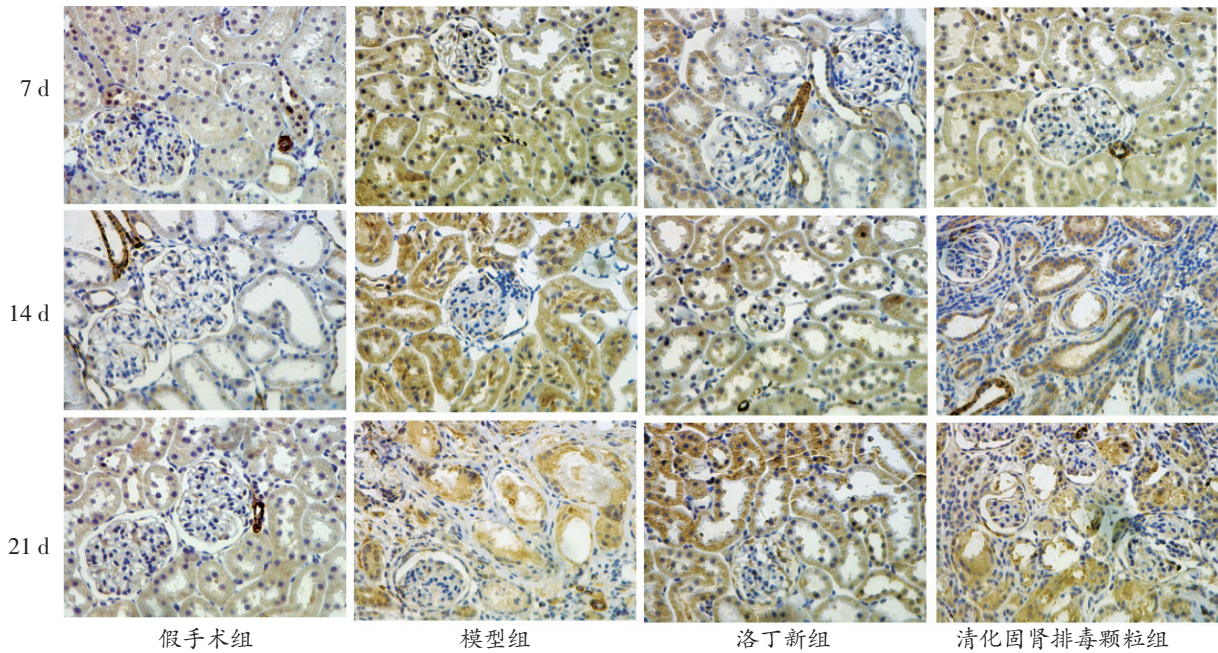


图3 各组大鼠不同时段肾组织 α -SMA 表达 (免疫组化染色, $\times 400$)

表3 各组大鼠各时段肾组织 α -SMA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$) %

组别	7 d	14 d	21 d
假手术组	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.02
模型组	0.26 ± 0.04 ^①	0.42 ± 0.07 ^①	0.59 ± 0.03 ^①
洛丁新组	0.16 ± 0.02 ^{①②}	0.30 ± 0.02 ^{①②}	0.44 ± 0.03 ^{①②}
清化固肾排毒颗粒组	0.17 ± 0.02 ^{①②}	0.31 ± 0.02 ^{①②}	0.42 ± 0.03 ^{①②}

与假手术组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

肾纤维化是慢性肾脏病发展至终末期的共同通路, 其中细胞因子过度表达和相关信号通路参与其中。研究表明, 转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 作为公认的致纤维化细胞因子在肾纤维化中发挥着关键作用, 可调节肾小管上皮细胞向间充质转化 (EMT)^[3-4]。EMT 是肾小管间质纤维化的关键环节之一。大量研究证明, 肾小管间质纤维化程度是判断肾脏病患者预后最重要的指标, 其主要病理表现为肾小管和肾间质被大量的细胞外基质 (ECM) 过度积聚, 出现大量的肌成纤维细胞^[5]。研究表明, α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 是肾小管上皮细胞向间充质转化 (EMT) 的主要标记蛋白^[6], 是肌成纤维细胞产生的标志^[7]。因此, TGF- $\beta 1$ 和 α -SMA 的表达对于 EMT 和 ECM 的进展及预后具有重要意义。

中医没有关于肾纤维化的专业术语, 但是其所表现出的临床症状, 可见于中医的水肿、腰痛、癃闭、

虚劳、关格等病症中^[8], 属于中医肾络病的范畴。肾络病的病机特点主要是“易滞易瘀、易入难出、易积成形”^[9], 治疗上以益气活血化瘀、利湿化痰祛浊为主。清化固肾排毒方是温州市中医院的自拟方, 方中黄芪健脾利尿消肿, 山药益气养阴、补脾固肾, 柴胡、白花蛇舌草清热, 大黄活血化瘀解毒, 白芥子清皮里膜外之痰, 全方共奏益气健脾、清热活血之功。前期的实验研究也表明清化固肾排毒方有抗肾纤维化、延缓肾功能的作用^[10]。

本研究 HE 染色结果显示, 模型组在第 7 天出现肾小管间质损伤, 肾小球病变不明显, 肾小管上皮细胞萎缩、坏死, 肾间质出现成纤维细胞增生, 且随着梗阻时间的延长, 逐渐加重, 在第 21 天时上述变化最为显著; 经过药物治疗后, 清化固肾排毒颗粒组和洛丁新组大鼠肾小管间质损伤指数减轻 ($P < 0.05$), 肾间质炎症细胞浸润减少, 肾纤维化程度减轻; 免疫组化显示, 模型组大鼠肾组织在第 7 天 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA 阳性表达明显升高 ($P < 0.05$), 且呈持续升高趋势, 在第 21 天时 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA 表达最为显著, 表明模型组大鼠出现上皮细胞向间充质转化和细胞外基质的过度积聚; 经过清化固肾排毒颗粒治疗后, TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA 阳性表达降低 ($P < 0.05$)。此前的文献也表明清化固肾排毒方是通过下调 TGF- $\beta 1$ 表达从而抗肾间质纤维化作用, 与本研究结果一致^[10-12]。

综上,清化固肾排毒颗粒具有抗肾纤维的作用,其机制可能是下调UO大鼠肾组织TGF- β 1和 α -SMA的表达,从而抑制肾小管上皮细胞向间充质转化和细胞外基质过度积聚,达到抗肾纤维化的作用,但由于肾纤维化机制的复杂性,清化固肾排毒颗粒抗肾纤维化相关信号通路之间相互联系及共同发生作用的机制仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 董飞侠,朱宗元,曾章超.清化固肾方治疗慢性肾炎的临床研究[J].江苏中医药,2006,27(1):28-29.
- [2] 陈念昭,冯如流,陈春,等.清化固肾排毒方治疗慢性肾功能不全患者45例疗效观察[J].浙江中医杂志,2015,50(5):353-354.
- [3] Ding Y, Choi ME. Regulation of autophagy by TGF- β : emerging role in kidney fibrosis [J]. Semin Nephrol, 2014, 34(1): 62-71.
- [4] Rhyu DY, Yang Y, Ha H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF- β 1 induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(3): 667-675.
- [5] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. Pediatr Nephrol, 2000, 15(3-4): 290-301.
- [6] 赵德安,毕凌云,杨达胜.桂枝茯苓胶囊对肾小管间质纤维化大鼠 α -平滑肌肌动蛋白、IV型胶原和转化因子- β 1表达的影响[J].临床儿科杂志,2013,31(1):65-68.
- [7] Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors [J]. Kidney Int, 2009, 75(5): 475-481.
- [8] 张承承.慢性肾功能衰竭中医证候学研究[D].北京:北京中医药大学,2007.
- [9] 贾振华,吴以岭.络病理论及其应用研究[C]//全国中医药中青年科技创新与成果展示论坛论文集.重庆:中国科学技术学会,2009.
- [10] 陈宇,罗婷,陈薪薪,等.清化固肾排毒方对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制[J].中华中医药学刊,2017,35(5):1268-1270.
- [11] 罗婷,程锦国,姜程曦,等.清化固肾排毒颗粒对肾纤维化大鼠Wnt通路Wnt1和 β -catenin表达的影响[J].中草药,2016,47(6):955-962.
- [12] 吴小燕,李丽艳,项协隆,等.“清化固肾排毒颗粒”对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织Wnt4和TGF- β 1表达的影响[J].江苏中医药,2016,48(8):75-78.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

《新中医》杂志稿约 (2018年)

《新中医》是由国家中医药管理局主管、广州中医药大学与中华中医药学会共同主办的国家级学术期刊,1969年创刊。标准刊号:ISSN 0256-7415, CN 44-1231/R,月刊,期刊代号:国内:46-38,国外:M186。根据国家的有关标准和科技期刊的编排规范,对来稿做出如下要求:一、**征稿内容**:本刊设有经方研究、临床研究、针灸研究、实验研究、思路研究、文献研究、护理研究等专栏。二、**来稿要求**:主题鲜明,论点明确,论据充分,文字精炼,内容真实,资料可靠,数据准确,数据比较应做统计学处理。三、**来稿格式**:参照本刊格式。四、**投稿方式**:在线投稿。网址: <http://xzzy.ijournal.cn>。五、**文责自负**:作者如有侵权行为,本刊不负连带责任。署名人的顺序由作者决定。依照《著作权法》,本刊对文稿有修改权、删节权,修改稿未按时寄回视作自动撤稿。六、**稿件采用**:需与编辑部签订论文著作权转让书,并及时寄回《新中医》编辑部档案室。编辑部地址:广州市番禺区广州大学城外环东路232号广州中医药大学办公楼《新中医》编辑部。邮编:510006。电话:020-39359588。