

# 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠 NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III 表达的影响

李岩岩<sup>1</sup>, 何泽云<sup>2\*</sup>, 吴凡<sup>1</sup>, 周艳利<sup>3</sup>

(1.郑州市第三人民医院, 河南 郑州 450000; 2.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007;  
3.广州市中医医院, 广东 广州 510130)

**[摘要]** **目的** 观察六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残肾转录因子-核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、单核细胞趋化因子(MCP-1)及 III 型胶原(Col-III)表达的影响,探讨六味地黄汤抑制肾间质纤维化进展的作用机制。**方法** 按照随机数字表法将 60 只 SD 雄性大鼠分为 5 组:空白组、假手术组、模型组、依那普利组、六味地黄汤组,每组 12 只,后三组行 5/6 肾切除术诱导大鼠肾衰模型,假手术组同期手术,但不损及肾脏。造模术后 3 d 进行灌胃干预。灌胃 8 周后处死各组大鼠,观察各组大鼠残肾组织形态学变化并用免疫组化法检测大鼠残肾 NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III 的表达。**结果** (1)观察 5/6 肾切除大鼠残肾组织细胞形态学,与模型组相比六味地黄汤、依那普利组可减轻大鼠肾间质损害及纤维化程度;(2)免疫组化半定量分析显示六味地黄汤组肾皮质的 NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 Col-III 表达均明显低于模型组( $P<0.05$ ),与依那普利组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 六味地黄汤可能通过下调 NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 Col-III 的表达,减少细胞外基质的积聚,减轻炎症反应和纤维化程度,抑制 5/6 肾切除大鼠肾间质纤维化进展,可作为慢性肾衰竭的辅助用药。

**[关键词]** 六味地黄汤;5/6 肾切除;转录因子-核因子  $\kappa$ B;单核细胞趋化因子;III 型胶原

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标识码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.05.005

## Effects of Liuwei Dihuang Decoction on NF- $\kappa$ B, MCP-1 and Col-III Expression in 5/6 Nephrectomized Rats

LI Yanyan<sup>1</sup>, HE Zeyun<sup>2\*</sup>, WU Fan<sup>1</sup>, ZHOU Yanli<sup>3</sup>

(1.The Third Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan 450000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Guangzhou Hospital of TCM, Guangzhou, Guangdong 510130, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of Liuwei Dihuang decoction on the expression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)and collagen type III (Col-III) in remnant kidney of 5/6 nephrectomized rats, and to investigate the mechanism of action for Liuwei Dihuang decoction on renal tubulointerstitial fibrosis. **Methods** The sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: blank group, sham-operation group, model group, enalapril group and Liuwei Dihuang decoction group, 12 rats in each group. The model group, enalapril group and Liuwei Dihuang decoction group adopted 5/6 nephrectomized induced into renal failure model. After 3 days of modeling, the rats were treated by gavage. After 8 weeks, rats were sacrificed, remnant kidney tissue morphological changes were observed and the expression of NF- $\kappa$ B, MCP-1, Col-III levels were tested by immunohistochemistry. **Results** (1) The cell morphology in remnant kidney of 5/6 nephrectomized rats was observed. Compared with model group, renal tubulointerstitial damage and fibrosis was reduced in Liuwei Dihuang decoction and enalapril group; (2) Compared with model group, NF- $\kappa$ B, MCP-1 and Col-III expression level were reduced markedly in Liuwei Dihuang decoction group ( $P<0.05$ ), there is no obvious difference

**[收稿日期]**2015-11-07

**[基金项目]**湖南省科技厅项目资助(2013SK3099)。

**[作者简介]**李岩岩,女,硕士,医师,研究方向:慢性肾脏病的防治。

**[通讯作者]**\* 何泽云,男,博士,教授,E-mail:hzy2005@zju.edu.cn。

between Liuwei Dihuang group and enalapril group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Liuwei Dihuang decoction may inhibit the expression of NF- $\kappa$ B, reduce the expression of MCP-1, decrease the accumulation of extracellular matrix, reduce the inflammation and fibrosis and delay the progress of renal interstitial fibrosis, which can be the adjuvant drug of chronic renal failure.

[**Keywords**] Liuwei Dihuang decoction; 5/6 nephrectomy; nuclear factor kappa B; monocyte chemoattractant protein-1; collagen type III

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种肾病进展到终末期肾病的基础,RIF的发生涉及炎性细胞浸润、肾小管损伤、肾间质成纤维细胞的增殖、细胞外基质过度沉积等过程<sup>[1]</sup>。单核细胞趋化因子(Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是特异性单核巨噬细胞趋化因子,它借助转录因子-核因子 $\kappa$ B(Nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),通过其同源受体-CCR2调节RIF的发生,在进行性器官纤维化中起重要作用。NF- $\kappa$ B参与了多种炎症因子和促纤维化因子的合成,最终导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)效应细胞被激活,产生大量ECM。Ⅲ型胶原(Collagen Type III, Col-III)是ECM的重要成分,其合成和降解的失衡是引起间质纤维化的直接原因之一。5/6肾切除是可以得到逐步进展至肾小球硬化、间质纤维化,最后出现肾功能衰竭的稳定动物模型。六味地黄汤以其安全有效的特点广泛运用于慢性肾脏病的临床治疗。本文通过探讨六味地黄汤对5/6肾切除大鼠残肾NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III的影响,探讨六味地黄汤抑制肾间质纤维化进展的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康SD雄性大鼠60只,体质量(200 $\pm$ 20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。许可证号:SCXK(湘)2013-0004。大鼠饲养环境保持通风、恒温,每日更换垫料,定期消毒笼具;每天给予12h灯光照射。

1.1.2 主要试剂与仪器 兔抗大鼠NF- $\kappa$ Bp65单克隆抗体,兔抗大鼠MCP-1单克隆抗体,兔抗大鼠Col-III单克隆抗体,PV-9000二步法免疫组化检测试剂,DAB显色剂试剂盒均购自北京中杉金桥生物工程公司。FINESSE325型石蜡切片机(英国珊顿公司);Motic BA410T生物显微镜(德国);BM-VIII

生物组织包埋机、CS-VI型摊片烤片机、TS-12A型生物组织自动脱水机(孝感市宏业医用仪器有限公司)。

1.1.3 实验药物 六味地黄汤(熟地黄24g,山茱萸12g,山药12g,泽泻9g,茯苓9g,牡丹皮9g)由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。制备方法:先将药材用相当于药材2倍的自来水浸泡2h,武火煮沸后再文火煎熬30min,将两煎液混合,于水浴锅上浓缩为含生药0.1g/mL的药液;马来酸依那普利片剂(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号H10042451)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 分组与造模 按照随机数字表法将大鼠随机等分为A组(空白组)、B组(假手术组)、C组(模型组)、D组(依那普利组)、E组(六味地黄汤组),每组12只。动物适用性喂养一周后,C、D、E组均按照文献[2]在无菌条件下行5/6肾切除手术。B组同期行两次手术,每次仅打开腹腔,暴露肾脏后,关腹。

1.2.2 药物干预 A、B、C组予等体积蒸馏水灌胃,1次/d;D组依那普利组以10mg/(kg·d)溶于等容积蒸馏水灌胃,1次/d。E组予六味地黄汤剂灌胃,剂量为6.75g/kg生药,相当于60kg体质量成人每天75g生药的等效剂量,1次/d;共给药8周。

### 1.3 检测项目和方法

实验结束后处死各组大鼠并取出残肾组织称重,观察残肾大体标本形态,将残肾组织行冠状切面,浸入4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,制成4 $\mu$ m切片,用于光镜及免疫组化染色。

1.3.1 肾脏病理检查 取石蜡块,4 $\mu$ m切片后分别进行HE、Masson染色,MOTIC光学显微镜下观察。

1.3.2 免疫组化染色 采用PV-9000二步法检测残肾组织中NF- $\kappa$ B、MCP-1及Col-III的表达,具体操作步骤如下:(1)切片常规脱蜡至水;(2)3% $H_2O_2$ 室温孵化10min,蒸馏水漂洗后;(3)热修复抗原,

冷却后用 PBS 液漂洗两次;(4) 从微波盒中拿出组织,放入保湿盒中,滴加适量的一抗工作液(约50 uL)分别为:兔抗大鼠 NF- $\kappa$ Bp65 单克隆抗体,兔抗大鼠 MCP-1 单克隆抗体,兔抗大鼠 Col-III 单克隆抗体;(5)滴加试剂 1,室温孵育 20 min,PBS 冲洗,5 min $\times$ 3 次,滴加试剂 2,室温孵育 20~30 min,PBS 冲洗,5 min $\times$ 3 次;(6)DAB 显色,苏木素轻度复染 5 min 到 8 min,脱水,透明,中性树胶封片。采用 IPP6.0 医学图像分析系统,每张切片随机选取 5 个不含肾小球和小血管的肾皮质 200 倍视野,测定累积光密度(IOD)值,对 NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 Col-III 进行图像分析。

#### 1.4 统计学分析

计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,用方差分析-LSD 法,方差不齐时,用校正方差分析法,应用 SPSS 18.0 统计软件包进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 动物存活情况

在造模过程及造模后两周内,模型组 4 只大鼠、依那普利组 2 只大鼠、六味地黄汤组 2 只大鼠死亡。死亡原因有麻醉意外、术中大出血及术后感染等。予以剔除。模型组剩余大鼠 8 只,依那普利组剩余大鼠 10 只、六味地黄汤组剩余大鼠 10 只。

### 2.2 肾组织光镜检查

**2.2.1 HE 染色** 5/6 肾切除大鼠残肾组织 HE 染色显示,空白组及假手术组:肾小球结构清晰,肾小管上皮细胞排列整齐。模型组:肾小球明显缩小、纤维化,肾小管上皮细胞萎缩、脱落,部分管腔不规则、扩张;肾间质可见淋巴细胞浸润及大量纤维结缔组织增生;依那普利组:可见被膜纤维增厚,肾小球轻度缩小,肾小管萎缩;六味地黄汤组:肾小球肥大、小管上皮细胞水肿;肾间质少量纤维结缔组织增生及轻度水肿。见图 1。

**2.2.2 Masson 染色** 5/6 肾切除大鼠残肾组织 Masson 染色显示:正常组及假手术组可见肾小球、肾小管结构正常,肾间质未见胶原纤维增生;模型组肾小球内及肾间质均可见大量胶原纤维;依那普利组可见局灶性间质纤维增生,部分小管纤维化;六味

地黄汤组可见部分小管纤维化,局灶性间质纤维化,肾间质胶原纤维增加。见图 2。

### 2.3 免疫组化检测结果

**2.3.1 NF- $\kappa$ Bp65 的表达** 空白组及假手术组可见肾小球及肾间质少量阳性表达;模型组、六味地黄汤组、依那普利组均为阳性表达,以模型组表达最强,依那普利组次之,六味地黄汤组表达最弱,阳性表达主要在皮质区肾小管上皮细胞,胞浆和胞核均见,以胞核表达较强。肾小球阳性表达较弱。见图 3。

**2.3.2 MCP-1 的表达** 空白组、假手术组可见肾小球及肾间质少量阳性表达;模型组、六味地黄汤组及依那普利组呈阳性表达,活化信号主要见于皮质区肾小管上皮细胞,以胞浆表达较强。见图 4。

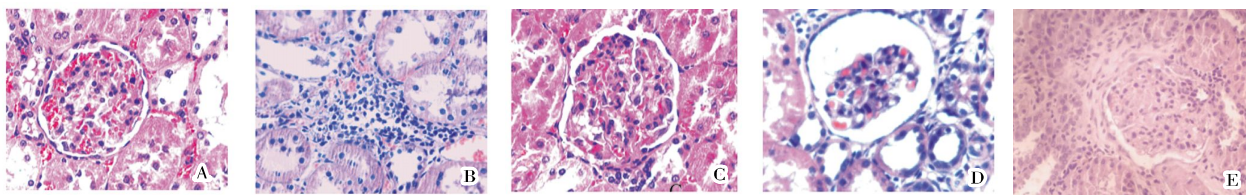
**2.3.3 Col-III 的表达** 空白组、假手术组 III 型胶原仅于肾间质及肾小管上皮细胞轻度表达。模型组肾小管间质可见大量阳性表达,与假手术比较表达显著增强。六味地黄汤组及依那普利组较模型组表达较弱。见图 5。

经 IPP(Image-pro Plus)图像半定量分析,计算切片 NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III 平均光密度值,进行统计学分析,模型组、六味地黄汤组、依那普利组分别与空白组和假手术组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),提示造模成功;与模型组比较,六味地黄汤组及依那普利组 NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III 平均光密度值较模型组明显减低,差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),提示六味地黄汤及依那普利均能降低 NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III 的表达;依那普利组与六味地黄汤组之间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠残肾组织 NF- $\kappa$ B、MCP-1、Col-III 平均光密度的定量分析 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	NF- $\kappa$ B	MCP-1	Col-III
空白组	12	0.2103 $\pm$ 0.0140	0.3003 $\pm$ 0.0084	0.3429 $\pm$ 0.0017
假手术组	12	0.2417 $\pm$ 0.0307	0.3044 $\pm$ 0.0067	0.3437 $\pm$ 0.0025
模型组	8	0.3058 $\pm$ 0.0099 $\Delta^{\Delta}$	0.4148 $\pm$ 0.0247 $\Delta^{\Delta}$	0.4001 $\pm$ 0.0013 $\Delta^{\Delta}$
依那普利组	10	0.2652 $\pm$ 0.0089 $\Delta^{\Delta\Delta}$	0.3644 $\pm$ 0.0257 $\Delta^{\Delta\Delta}$	0.3774 $\pm$ 0.0007 $\Delta^{\Delta\Delta}$
六味地黄汤组	10	0.2643 $\pm$ 0.0467 $\Delta^{\Delta\Delta}$	0.3456 $\pm$ 0.0201 $\Delta^{\Delta\Delta}$	0.3762 $\pm$ 0.0007 $\Delta^{\Delta\Delta}$
F 值		5.321	4.463	9.652
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与空白组相比, $\Delta P<0.05$ ;与假手术组相比, $\Delta P<0.05$ ;与模型组相比, $\Delta^{\Delta} P<0.05$ , $\Delta^{\Delta\Delta} P<0.01$ 。



A.空白组;B.假手术组;C.模型组;D.依那普利组;E.六味地黄汤组(下图同)

图 1 各组肾脏病理学光镜图(HE 染色,×400)

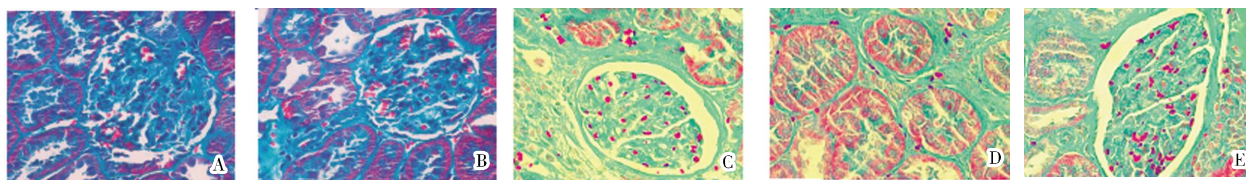


图 2 各组肾脏病理学光镜图(Masson 染色,×400)

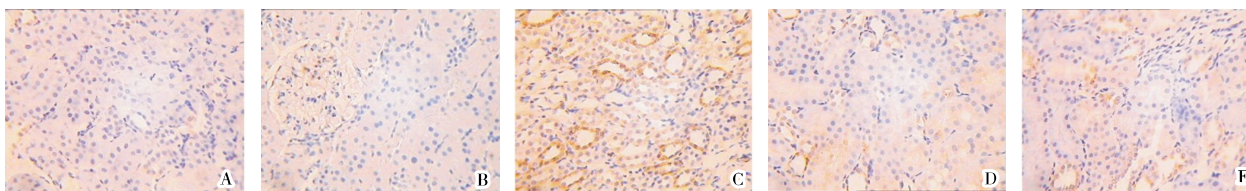
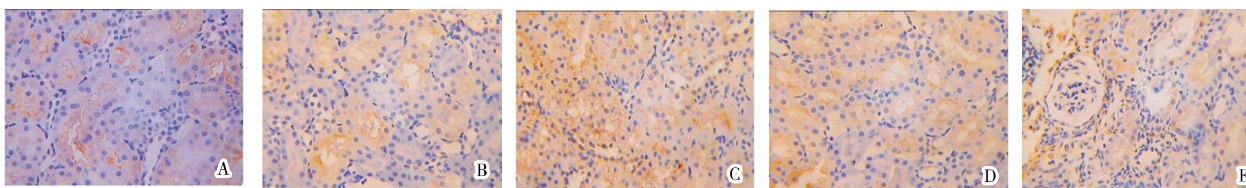
图 3 各组免疫组化 NF- $\kappa$ Bp65 表达光镜图(×200)

图 4 各组免疫组化 MCP-1 表达光镜图(×200)

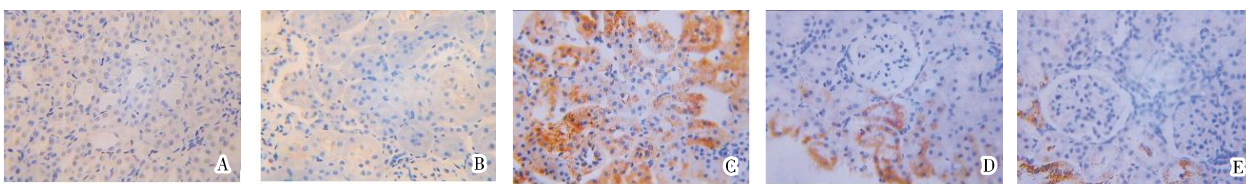


图 5 各组免疫组化 Col-III 表达光镜图(×200)

### 3 讨论

肾脏疾病进展至慢性肾衰竭的发病机制,至今尚无定论,其共同的通路包括肾脏萎缩、纤维化<sup>[3]</sup>。肾脏纤维化包括肾小球硬化和间质纤维化。RIF 是指各种致病因子如炎症、损伤等作用下,间质细胞及细胞间质增多,基质蛋白合成增加,基质降解受抑制造成 ECM 大量堆积。目前认为 RIF 的主要发生机制为:(1)小管上皮细胞向间充质细胞的转分化作用;(2)主要效应细胞的激活;(3)局部缺血、缺氧<sup>[4]</sup>。炎症损伤是间质纤维化发生发展的重要因素。

MCP-1 是特异性单核巨噬细胞趋化因子,主要由单核细胞产生,亦可由肾小管上皮细胞产生,它本身具有独特的信号通路,即借助 NF- $\kappa$ B。可以不依赖酪氨酸激酶或者蛋白激酶的途径,通过其同源受体-CCR2 调节 RIF 的发生,在进行性器官纤维化中起重要作用。单核/巨噬细胞浸润肾间质,肾小管上皮细胞即被活化,MCP-1 分泌增多,趋化炎症细胞,参与早期炎症反应。现有的研究表明,MCP-1 在多种肾脏疾病中参与了小球和间质的巨噬细胞积聚,而阻断 MCP-1 可以减少巨噬细胞积聚并伴肾脏损伤的减轻<sup>[5]</sup>。



NF- $\kappa$ B 作为转录因子家族的重要成员之一,参与了多种炎症因子和促纤维化因子的合成,在免疫炎症反应、抗凋亡及肿瘤发生中起着重要的作用<sup>[6]</sup>。并且可以认为是炎症反应的触发器,活化后会“瀑布式”地诱导机体产生一系列的炎症因子(包括 IL-2、IL-8 及 TNF 等)及组织因子、粘附分子等基因的转录,包括 MCP-1,发挥着中心环节作用于炎症反应中。其异常激活可能是肾小球肾炎发生的始动机制之一<sup>[7]</sup>。一些被 NF- $\kappa$ B 激活的因子又会反过来进一步诱导 NF- $\kappa$ B 的激活,生物体内产生级联放大的炎症反应。导致 ECM 效应细胞被激活,产生大量 ECM。Ⅲ型胶原是 ECM 的重要成分,其合成和降解的失衡是引起间质纤维化的直接原因之一。正常情况下Ⅲ型胶原在肾小管上皮细胞及肾间质轻度表达。肾间质积聚的基质蛋白主要为 I 型胶原、Ⅲ型胶原和纤维连接蛋白<sup>[8]</sup>。在高滤过、高灌注的状态下或血管内皮细胞发生损伤时,促使肾脏产生多种细胞因子,促进肾间质成纤维细胞合成Ⅲ型胶原增加,导致间质纤维化。ECM 持续性沉积通过形成纤维瘢痕,破坏正常肾组织,导致肾实质塌陷、肾功能丧失<sup>[9]</sup>。

中医理论认为肾间质纤维化的病机主要是虚、瘀、痰湿和浊毒。根据中医理论着手对补益药,活血药,化湿药,解毒药亦做过大量实验,并验证诸如黄芪、冬虫夏草、红花、丹参、大黄等单味药,黄芪当归合剂、肾衰保肾汤、归脾汤、肾康注射液等复方制剂均有一定治疗肾间质纤维化的作用<sup>[10]</sup>。本篇主要从虚着手,选用被后世誉为“补阴方药之祖”的六味地黄汤。其由熟地黄、山茱萸、怀山药、牡丹皮、泽泻、茯苓六味药组成,主治肾阴虚证。既往研究证实:六味地黄丸(汤)是临床上治疗肾阴虚证型慢性肾小球肾炎的有效方剂<sup>[11]</sup>。

本实验的阳性对照药物依那普利是血管紧张素转换酶抑制剂类药物,可降压、减少尿蛋白、减少肾小球细胞外基质的蓄积,减轻肾间质纤维化和肾小球硬化,延缓肾损害进展。本实验发现六味地黄汤组、依那普利组均可减轻 5/6 肾切除大鼠残肾组织的病理改变,减少肾间质中胶原纤维面积,抑制

NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 Col-Ⅲ 的表达。

综上所述,肾间质 NF- $\kappa$ B、MCP-1 的高水平可引起 ECM 效应细胞被激活,Ⅲ型胶原合成和降解的失衡,Ⅲ型胶原增加,导致间质纤维化。六味地黄汤可能通过下调 NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 Col-Ⅲ 的表达,早期干预炎症损伤,减少细胞外基质的积聚,抑制肾间质纤维化进展。因而,六味地黄汤可作为慢性肾衰竭的早期辅助用药。

#### 参考文献:

- [1] Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010,6(11):643-656.
- [2] SM Shea, J Raskova and A. B. Morrison. A stereologic study of glomerular hypertrophy in the subtotal nephrectomized rat[J]. *Am J pathol*, 1978,90:201.
- [3] Kim JH, Ha S, Hwang C, et al. Gene expression profiling of anti-GBM glomerulo nephritis model: the role of NF- $\kappa$ B in immune complex kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2004(66): 826-837.
- [4] 曾海飞,何泽云,徐琴,等.六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠 MMP-2、TIMP-2 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*, 2013,33(7): 13-17.
- [5] 彭亚军,张继波,何泽云,等.六味地黄汤对单侧输尿管结扎大鼠肾间质 MCP-1 及 TGF- $\beta$ 1 表达的影响[J].*中国中西医结合肾病杂志*, 2009,10(7):587-590.
- [6] Suzuki K, Wang R, Kubota H, et al. Kinetics of biglycan, decorin and thrombospondin in linmercuric chlorides-induced renal tubulointerstitial Fibrosis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2007,9(1): 68-73.
- [7] 王颖航,潘志,南红梅,等.肾纤维化的分子病理机制探讨[J].*中国中西医结合肾病杂志*, 2006,7(1):34-37.
- [8] 李国霞,黄文政,朱小棣.肾疏宁对肾小管间质损害大鼠 FN、Col Ⅲ、PAI-1 mRNA 的作用[J].*中国中西医结合肾病杂志*, 2007,8(7): 388-390.
- [9] Chen WC, Lin HH, Tang MJ. Regulation of proximal tubular cell differentiation and proliferation in primary culture by matrix stiffness and ECM components [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(6): F695.
- [10] 田锋,张彤,李淑菊.中药抗肾间质纤维化的研究进展[J].*黑龙江中医药*, 2015, 44(2):64-65.
- [11] 何泽云,徐元美.六味地黄丸治疗肾阴虚型慢性肾小球肾炎的临床研究[J].*湖南中医学院学报*, 2004,24(1):35-37.

(本文编辑 杨 瑛)