

·方药研究·

金匮肾气丸对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 p-STAT3 蛋白的影响

刘春燕¹,朱伟¹,唐群¹,梅文娟²,陆苗苗³,丁志高¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.南昌大学第一附属医院,江西 南昌 330006;

3.辽宁医学院附属第一医院,辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的 探讨金匮肾气丸对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠肾间质纤维化的影响及对 p-STAT3 蛋白表达的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为假手术组、UUO 模型组、金匮肾气丸低剂量组、金匮肾气丸高剂量组、阳性对照药依那普利组,UUO 术后第 1 天开始灌胃,第 14 天处死大鼠,取梗阻肾组织,HE 和 Masson 染色观察肾组织病理改变,免疫组织化学检测 I 型和 III 型胶原在肾组织的蛋白表达,Real-time PCR 法检测 I 型和 III 型胶原在肾组织的 mRNA 水平,Western 印迹检测磷酸化的信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在肾组织的表达。**结果** 与 UUO 模型组比较,金匮肾气丸治疗后,肾间质损伤指数降低,间质胶原阳性面积减少,I 型和 III 型胶原蛋白及 mRNA 表达减少,磷酸化 STAT3 蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 金匮肾气丸可以减轻 UUO 大鼠梗阻肾组织肾间质损伤,减少间质内胶原沉积,其作用机制可能与抑制 STAT3 磷酸化有关。

[关键词] 金匮肾气丸;肾纤维化;单侧输尿管梗阻;大鼠;p-STAT3 蛋白;熟地黄;山茱萸;山药

[中图分类号]R277.5;R285.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.10.006

Effect of Jinguì Shenqi Pill on the Expression of p-STAT3 in Unilateral Ureteral Obstruction Rats

LIU Chunyan¹, ZHU Wei¹, TANG Qun¹, MEI Wenjuan², LU Miaomiao³, DING Zhigao¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Jinguì Shenqi pill on unilateral ureteral obstruction (UUO) rats with renal interstitial fibrosis and the expression of p-STAT3 protein. **Methods** 30 male SD rats were randomly divided into sham operation group, UUO model group, low dose of Jinguì Shenqi pill group, high dose of Jinguishenqi pill group, enalapril treatment group as positive control. After intragastric administration on the 14 days, the rats were sacrificed. The obstructive kidney tissues were stained with HE and Masson to observe the pathologic changes. The protein or mRNA expression of type I and III collagen in renal tissue was detected by immunohistochemistry staining or Real-time PCR. The phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in renal tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with UUO model group, after treatment with Jinguì Shenqi pill, the renal interstitial damage index and collagen positive area were decreased, the expression of type I and type III collagen protein and mRNA were also decreased and the phosphorylation of STAT3 protein was inhibited ($P<0.05$). **Conclusion** Jinguì Shenqi pill can obviously improve renal interstitial injury and reduce interstitial collagen deposition in UUO rats which may be related to the inhibition of STAT3 phosphorylation

[Keywords] Jinguì Shenqi pill; renal fibrosis; unilateral ureteral obstruction rats; p-STAT3; prepared radix rehmanniae; semen corni; Chinese yam

[收稿日期]2016-04-01

[基金项目]国家自然科学基金青年项目(81503442);国家自然科学基金青年项目(81603470);湖南省教育厅科研项目(11C0953)。

[作者简介]刘春燕,女,博士,研究方向:慢性肾脏病的防治,E-mail:liuchunyan0221@126.com。

肾纤维化是指由各种原因引起的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分在肾组织内过度沉积, 是所有慢性肾脏病进展到终末期肾病的共同途径和病理基础, 控制肾纤维化, 对于治疗慢性肾脏病、延缓慢性肾衰竭的进展起关键作用^[1]。金匱肾气丸是张仲景《金匱要略》中的名方, 广泛应用于泌尿生殖系统、神经系统、免疫系统等疾病治疗。现代药理学研究发现, 金匱肾气丸可通过作用于糖皮质激素受体、淋巴细胞亚群、神经生长因子等靶点参与调节下丘脑-垂体-靶腺轴、免疫系统和神经系统等功能^[2-3], 同时具有良好的抗器官纤维化作用^[4]。本研究采用大鼠单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO), 观察金匱肾气丸对大鼠肾间质纤维化的疗效, 并探讨其作用机制是否与抑制 STAT3 磷酸化有关。

1 材料

1.1 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 4~6 周龄, 体质量 180~220 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号: 4304702551。

1.2 试药

金匱肾气丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 药丸碾碎并加生理盐水配成混悬液, 浓度为 0.25 g/mL。Masson 三色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司; 兔抗大鼠 I 型胶原多克隆抗体、兔抗大鼠 III 型胶原多克隆抗体、Fibronectin 抗体购自美国 Abcam 公司; α -SMA 抗体购自美国 Sigma 公司; p-STAT3 (Ser727) 和 STAT3 抗体购自美国 Cell signaling technology 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Thermo 公司; SP 免疫组织化学染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; Real-time PCR 试剂盒和逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器

BH-2 光学显微镜购自日本 Olympus 公司, 转移电泳槽和电泳仪购自上海天能科技有限公司, 低温微型离心机购自 Eppendorf 公司, CFX96TM 实时定量 PCR 仪、SDS PAGE 微型凝胶电泳及转膜设备购自美国 BioRad 公司, 酶标仪购自美国 BioTek 公司, 全自动上液高速软片冲洗机购自江苏泰泉电子

自动化设备有限公司。

2 方法

2.1 实验分组及模型建立

所有大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表的方法, 将 30 只大鼠分为假手术组、UUO 模型组、金匱肾气丸低剂量组 (1.25 g/kg)、金匱肾气丸高剂量组 (2.5 g/kg)、阳性对照药依那普利组 (10 mg/kg), 每组 6 只。除假手术组外, 其余各组大鼠行左侧输尿管结扎手术建立 UUO 大鼠肾纤维化模型。每天 1 次给予相应药物灌胃, 假手术组和 UUO 模型组灌胃等容量生理盐水。连续用药 14 d, 处死大鼠, 取左侧肾组织标本。

2.2 肾组织病理学检查

将肾组织于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 常规石蜡包埋切片, 行 HE 和 Masson 染色。在 200 倍光学显微镜下观察 HE 染色切片, 盲法依序观察右上、右下、中间、左上、左下 5 个肾小管间质视野, 按肾间质损伤 8 项指标评分: 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、间质细胞浸润, 计算均值^[5]。在 200 倍光学显微镜下观察 Masson 染色切片, 苯胺蓝将胶原纤维染成蓝色, 盲法随机观察 20 个互不重叠视野, 计算阳性面积占整个视野 (避开大血管和肾小球) 的百分比并计分, 取均值。计分标准如下: 0 分, 无染色; 1 分, <25% 阳性面积; 2 分, 25~50% 阳性面积; 3 分, 50~75% 阳性面积; 4 分, 75~100% 阳性面积^[6]。

2.3 免疫组织化学

采用 SP 法, 按照试剂盒的操作步骤, 检测 I 型和 III 型胶原在梗阻肾组织的表达。光镜下肾间质中条索状或波纹状棕黄色为阳性表达, 200 倍下随机采集 20 个皮质及外髓视野 (除大血管外), 运用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件分析阳性面积百分比, 取均值^[7]。

2.4 Real-time PCR

总 RNA 提取及逆转录反应按说明书步骤进行。引物序列均根据 Gene Bank, 用 Primer 5.0 软件设计完成。Collagen I 上游引物 5'-TCAGGGGC-GAAGGCAACA'-GT-3', 下游引物: 5'-TTGGGATG-GAGGGAGTTTACACGA-3'; Collagen III 上游引物: 5'-AAGGGCAGGGAACAACACTGAT-3', 下游引物:

5'-GTGAAGCAGGG-TGAGAAGAAAC-3'; β -actin 上游引物:5'-GGCCAACCGTGAAAAGATGA-3',下游引物:5'-GACCAGAGGCATACAGGGACAA-3'。PCR反应总体积为10 μ L,组分如下:SYBR Premix Ex Taq 5 μ L,10 μ M collagen I (或 collagen III)上下游引物各 0.25 μ L,适当稀释的 cDNA 0.5 μ L,ddH₂O 4 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C30 s;95 $^{\circ}$ C5 s,60 $^{\circ}$ C30 s,40个循环;再 95 $^{\circ}$ C15 s,60 $^{\circ}$ C15 s,95 $^{\circ}$ C15 s。实时荧光定量利用 PCR 技术通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析相对基因表达差异,数据分析采用下列公式: $\Delta\Delta CT=(CT_{Target}-CT_{Actin})_{Time x}-(CT_{Target}-CT_{Actin})_{Time 0}$, Time x 表示任意时间点,Time 0 表示经 β -actin 校正后 1 倍量的目标基因表达。

2.5 Western 印迹

采用 2 \times SDS 裂解液提取肾组织总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PVDF 膜。牛奶室温封闭 1 h 后,分别加入 FN、 α -SMA、p-STAT3/STAT3 一抗 (1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 3 次,加入二抗 (1:5 000),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,用 ECL 显色并曝光,采用 Image J 软件进行条带灰度扫描。

2.6 统计学分析

实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,运用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。若数据符合正态分布及方差齐性,采用多组间单因素方差分析方法 (LSD);若数据方差不齐或不符合正态分布,进行秩转换后采用 Kruskal-Wallis 检验, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠梗阻肾组织病理变化及肾间质损伤指数、胶原相对面积比较

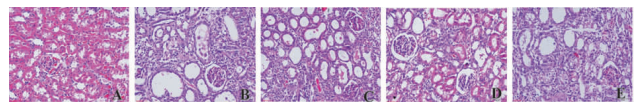
光镜下观察肾组织 HE 和 Masson 染色切片并进行半定量分析,结果显示假手术组肾组织无明显病理改变;UO 模型组肾小管扩张,部分管腔内有蛋白质管型,肾小管上皮细胞萎缩或空泡变性,局部间质内有巨噬细胞、淋巴细胞浸润,间质内成纤维细胞增生、胶原纤维增多;金匱肾气丸低剂量和高剂量及依那普利治疗后,上述病变减轻,且金匱肾气丸高剂量组病变最轻。肾间质损伤指数评分显示,模型组与假手术组比较,肾间质损伤指数明显增高 ($P<$

0.01);各治疗组与模型组比较,肾间质损伤指数明显降低 ($P<0.05$),其中金匱肾气丸高剂量组肾间质损伤指数比依那普利组明显降低 ($P<0.05$),见表 1、图 1。对 Masson 染色胶原含量进行半定量分析发现,UO 模型组肾间质胶原阳性面积评分明显高于假手术组 ($P<0.01$),各治疗组肾间质胶原阳性面积评分显著降低 ($P<0.05$);其中金匱肾气丸高剂量组评分最低,与依那普利组比较有统计学差异 ($P<0.05$),见表 1、图 2。

表 1 各组大鼠梗阻肾组织肾间质损伤指数、

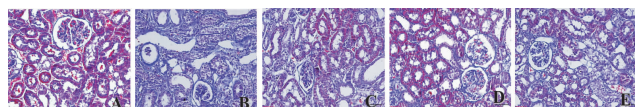
分组	胶原相对面积比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)	
	肾间质损伤指数	胶原面积百分比评分
假手术组	0.27 \pm 0.13	0.25 \pm 0.03
模型组	8.78 \pm 0.91*	2.15 \pm 0.25*
金匱肾气丸低剂量组	6.92 \pm 0.63 [#]	1.65 \pm 0.31 [#]
金匱肾气丸高剂量组	6.11 \pm 0.66**	1.31 \pm 0.18**
依那普利组	7.06 \pm 0.35 [#]	1.62 \pm 0.19 [#]
F 值	30.36	50.84
P 值	0.00	0.00

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与依那普利组比较,** $P<0.05$ 。



注:A-E 依次为假手术组、模型组、金匱肾气丸低剂量组、金匱肾气丸高剂量组、依那普利组。

图 1 各组大鼠肾脏病理学改变光镜图 (HE 染色 $\times 200$)



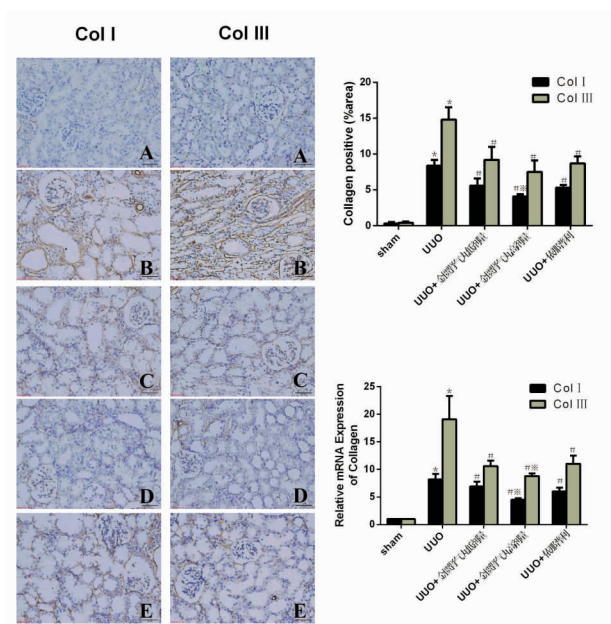
注:A-E 依次为假手术组、模型组、金匱肾气丸低剂量组、金匱肾气丸高剂量组、依那普利组。

图 2 各组大鼠肾脏病理学改变光镜图 (Masson 染色 $\times 200$)

3.2 各组大鼠梗阻肾组织 I、III 型胶原的蛋白及 mRNA 表达情况

假手术组肾组织仅在血管周围有棕黄色胶原表达,肾间质中无 I、III 型胶原表达;14 d 模型组肾间质可见大量染成棕黄色条索状的 I、III 型胶原表达;金匱肾气丸低、高剂量治疗组和依那普利治疗组肾间质 I、III 型胶原表达较模型组明显减少,I、III 型胶原阳性面积百分比显著降低 ($P<0.05$),其中金匱肾气丸高剂量组的 I、III 型胶原阳性面积百分比低于依那普利对照组。模型组肾间质 I、III 型胶

原 mRNA 表达水平明显高于假手术组 ($P<0.05$);金匱肾气丸低、高剂量治疗组和依那普利治疗组肾间质 I、III 型胶原 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$),其中金匱肾气丸高剂量组的 I、III 型胶原 mRNA 表达水平低于依那普利对照组。见图 3。



A-E 分别为假手术组、模型组、金匱肾气丸低剂量组、金匱肾气丸高剂量组、依那普利组

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与依那普利组比较,※ $P<0.05$ 。

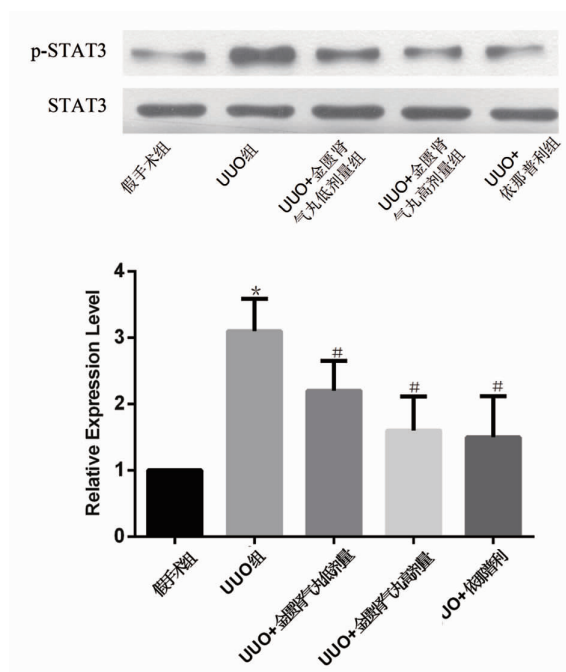
图 3 各组大鼠肾组织 I、III 型胶原蛋白及 mRNA 表达的比较光镜图×200(左列)及柱形图(右列)

3.3 各组大鼠梗阻肾组织 p-STAT3 蛋白的表达情况

模型组大鼠肾组织 p-STAT3 表达水平明显增高 ($P<0.01$),金匱肾气丸低、高剂量治疗组和依那普利治疗组 p-STAT3 表达明显降低 ($P<0.05$),三个治疗组间没有显著性差异,见图 4。

4 讨论

目前临床上治疗肾纤维化的措施主要包括两个方面:一是针对原发病的病因治疗,二是针对肾纤维化本身的治疗。原发病因的去除并不能完全抑制肾纤维化的发展,而肾纤维化病变反过来又可以影响原发病的治疗效果^[8],因此针对肾纤维化本身的治疗尤其重要。但是,目前临床缺乏有效的抗肾纤维化药物。血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素 II 型受体拮抗剂是目前临床上应用较多的抗肾纤维化药物,但这两类药物均只能延缓肾纤维化的



注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图 4 Western blot 检测各组大鼠梗阻肾组织 p-STAT3 蛋白的表达电泳图(上)及柱形图(下)

进程,并不能十分有效的阻止慢性肾脏病向终末期肾脏病的进展,而且在已存在肾功能衰竭患者中的应用尚存争议^[9]。目前在研的抗肾纤维化药物主要有:抗转化生长因子- β 拮抗剂、松弛素、秋水仙碱、己酮可可碱、肝细胞生长因子及骨形成蛋白-7 等,但这些药物均仍处于临床前研究阶段,其临床实际疗效及毒副作用有待进一步验证,而且这些药物往往针对某一个导致纤维化的靶点,不能从整体上防治纤维化的发生。中医辨证论治,从整体上改善人体的内环境,从各个环节防治纤维化的发生。研究显示,中医药在防治肾纤维化方面具有广阔的前景。

中医认为,各种慢性肾病进展到肾功能衰竭的过程属阳气衰败,水湿瘀浊内聚,正虚邪实、脾肾衰败、浊毒内蕴、肾络瘀阻是其基本病理,虚、瘀、湿是其特点。肾纤维化早中期多见脾肾气虚或脾肾气阴两虚;随着病情进一步发展,肾虚气乏乏力,脾虚水湿不运,湿浊日久化热、生毒、成瘀,变证丛生。正虚贯穿疾病始末,扶助正气是延缓和阻止慢性肾纤维化进程的重要方法。故需用温阳利水、化瘀降浊中药。肾气丸来源于东汉末年张仲景所著《金匱要略》一书,所以又名金匱肾气丸,是温补肾阳的代表方,也是最早的补肾方剂。方中用熟地黄滋阴补肾,山茱萸、山药补肝脾而益精血;以少量肉桂、附子温补

肾阳,可微生少火以生肾气;泽泻、茯苓利水渗湿泄浊,牡丹皮清肝泻火、活血散瘀,调血分之滞,其与滋阴补肾药相配,意在寓泻于补,以泻助补。

本研究采用肾间质纤维化的经典动物模型 UUO 作为研究对象,观察金匱肾气丸对 UUO 大鼠肾间质纤维化的影响,并采用血管紧张素转换酶抑制剂依那普利作为阳性对照药。结果显示,金匱肾气丸低剂量、高剂量和依那普利组均能有效改善肾间质损伤,与模型组相比,肾小管上皮细胞空泡变性少,萎缩或扩张的肾小管少,间质胶原纤维沉积和炎症细胞浸润少($P<0.05$);其中金匱肾气丸高剂量组病变最轻,且肾间质损伤指数评分低于依那普利组($P<0.05$)。同时,通过 Masson 染色,我们发现各治疗组的梗阻肾脏胶原纤维沉积比 UUO 组减少,胶原面积评分明显低于 UUO 组($P<0.05$);其中金匱肾气丸高剂量组的评分低于依那普利组($P<0.05$)。I 型和 III 型胶原是肾间质纤维化时细胞外基质的主要成分,因此通过免疫组织化学方法和 real-time PCR 方法来研究金匱肾气丸对梗阻肾间质中 I、III 型胶原的蛋白表达水平和 mRNA 表达水平的影响。结果显示,各治疗组均能显著下调 I、III 型胶原的蛋白和 mRNA 水平($P<0.05$),其中金匱肾气丸高剂量组的 I、III 型胶原的蛋白和 mRNA 水平显著低于依那普利组($P<0.05$)。

JAK/STAT 信号通路是一条由多种细胞因子和生长因子介导的信号转导通路,参与细胞的增生、分化、凋亡及免疫调节等重要生理过程。STAT 作为 JAK 的靶蛋白,是存在于胞质中的一个转录因子家族,其中 STAT3 是该家族的重要成员,且与肾脏疾病的关系最为密切^[10-11]。多项研究证实,UUO 模型肾间质中成纤维细胞的增殖及细胞外基质的增多与 STAT3 的激活相关^[12-13]。本实验结果显示,UUO 模型组大鼠梗阻肾组织中 STAT3 表达明显增高,金匱肾气丸治疗后可降低 UUO 梗阻肾组织中 STAT3 的表达,推测金匱肾气丸可能通过抑制 STAT3 的磷酸化来起到减轻肾间质纤维化的作用。

综上所述,金匱肾气丸可以减轻 UUO 梗阻肾组织肾间质损伤和胶原沉积,降低肾组织中 I 型和 III 型胶原的表达,并抑制 STAT3 的磷酸化;高剂量的金匱肾气丸对肾间质损伤的保护作用及减少胶原沉

积的作用优于依那普利。所以认为,金匱肾气丸可以改善 UUO 模型肾间质纤维化,其作用机制可能与其抑制 STAT3 的磷酸化有关。

参考文献:

- [1] LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, et al. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis [J]. Nat Med, 2013, 19(2): 227-231.
- [2] 王雨桐,王 蕾.金匱肾气丸的临床和药理实验研究进展[J]. 中医药导报,2015,21(5): 53-55.
- [3] 林吉祥.金匱肾气丸改善老年肾气虚证的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2013,33(12):16-17.
- [4] 王高强,刘 成,罗 明.肾气丸对 DMN 大鼠肝纤维化干预作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):237-241.
- [5] Radford MJ, Donadio JV, Bergstralh EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 1997,8(2): 199-207.
- [6] Lin SL, Chen RH, Chen YM, et al. Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor[J]. J Am Soc Nephrol, 2005,16(9): 2702-2713.
- [7] Broekema M, Harmsen MC, van Luyn MJ, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(1): 165-175.
- [8] Boffa JJ, Ronco P. Strategies to reverse fibrotic lesions of the kidney[J]. Presse Med, 2007, 36 (12Pt2): 1857-1864.
- [9] Weir MR. Effects of renin-angiotensin system inhibition on end-organ protection: can we do better [J]. Clin Ther, 2007, 29 (9): 1803-1824.
- [10] Takahashi T, Abe H, Arai H, et al. Activation of STAT3/Smad1 is a key signaling pathway for progression to glomerulosclerosis in experimental glomerulonephritis [J]. J Biol Chem, 2005, 280(8): 7100-7106.
- [11] Lu TC, Wang ZH, Feng X, et al. Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy [J]. Kidney Int, 2009, 76(1): 63-71.
- [12] Pang M, Wang ZH, Feng X, et al. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(4): 996-1005.
- [13] Kuratsune M, Masaki T, Hirai T, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction[J]. Nephrology (Carlton), 2007, 12(6): 565-571.