

本文引用:陈琇萌,俞小敏,肖洁.尿毒清颗粒抑制大鼠肾脏间质纤维化作用靶点研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(1):33-37.

尿毒清颗粒抑制大鼠肾脏间质纤维化作用靶点研究

陈琇萌,俞小敏*,肖洁

(广州医科大学附属第一医院肾内科,广东 广州 510120)

[摘要] **目的** 研究尿毒清抑制大鼠肾脏间质纤维化的作用。**方法** 采用单侧输尿管结扎术制备肾间质纤维化大鼠模型,将10周龄SPF级雄性大鼠60只,随机分3组:假手术(Sham, $n=20$)、模型组(UUO, $n=20$)和尿毒清治疗组(UNQ, $n=20$);UNQ组于术前1天给予尿毒清2 g/(kg·d)灌胃,假手术组及模型组每天灌胃等量生理盐水,各组分别于术后第3、7、14天处死5只大鼠,取梗阻侧肾脏进行组织学检查,对肾间质细胞浸润、肾小管萎缩和肾间质纤维化情况进行半定量评分;采用免疫组化、ELISA和Western Blot分别分析肾组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、纤粘连蛋白(FN)表达。**结果** 与Sham相比,UUO大鼠各时间点的病理损害进行性加重,肾小管间质中TGF- $\beta 1$ 、FN表达均增高($P<0.05$)。与UUO相比,尿毒清治疗后3 d,可观察到大鼠的肾间质炎性细胞浸润、肾小管萎缩及肾间质纤维化($P<0.05$)明显减轻,同时肾组织中TGF- $\beta 1$ 表达减少($P<0.05$);治疗后7 d,上述治疗作用持续存在,同时进一步使UUO大鼠肾间质的FN表达下降($P<0.05$);治疗14 d后,肾间质细胞浸润情况评分(CIS)和慢性病变(包括肾小管萎缩和间质纤维化)评分(AFS)较UUO组分别下降22.2%和19.1%($P<0.05$),TGF- $\beta 1$ 、FN的表达则较UUO组分别减轻30.8%和30%($P<0.05$)。**结论** 尿毒清的保护作用表现在肾损伤的开始就通过减少TGF- $\beta 1$ 表达从而使肾间质炎症细胞浸润受到抑制,同时还能减少病变肾组织细胞外基质的积聚,从而减轻肾间质纤维化。

[关键词] 尿毒清颗粒;肾脏间质纤维化;TGF- $\beta 1$;单侧输尿管梗阻模型

[中图分类号] R285.5;R692

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.01.008

Study on the Target of Niaoduqing Granule Inhibiting Renal Interstitial Fibrosis in Rats

CHEN Xiumeng, YU Xiaomin*, XIAO Jie

(Division of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Niaoduqing granule on renal interstitial fibrosis in rats. **Methods** The renal interstitial fibrosis rat models were built by unilateral ureteral obstruction (UUO). Ten weeks old male rats ($n=60$) were randomly divided into sham-operated group (Sham, $n=20$), model group (UUO, $n=20$) and UUO treated with Niaoduqing group (UNQ, $n=20$). The rats in UNQ were treated with 2 g/kg·d Niaoduqing by gastric gavage on one day before the operation. The Sham and UUO groups were given a gavage of same volume normal saline every day. Five rats in each group were sacrificed on 3, 7 and 14 days after surgery. The renal tubular interstitial fibrosis lesion and the expression of TGF- $\beta 1$ and FN were detected by pathological examine and immunohistochemistry and ELISA and Western Blot. **Results** Compared with the Sham group, the number of infiltrated inflammatory cells in renal interstitial and the score of renal interstitial fibrosis was aggravated, TGF- $\beta 1$ and FN expression were gradually increased in UUO group ($P<0.05$). Compared with the UUO group, the number of infiltrated inflammatory cells in renal interstitial and the score of renal interstitial fibrosis was fewer ($P<0.05$) and the expression of TGF- $\beta 1$ was decreased ($P<0.05$). After 7 days of treatment, the expression of FN in renal interstitium of UUO rats was decreased ($P<0.05$). After 14 days of treatment, the scores of cell infiltration and chronic lesions in renal interstitium had a decline of 22.2% and 19.1% than UUO group ($P<0.05$), while the expression of TGF- $\beta 1$ and FN was decreased 30.8% and 30% than UUO group ($P<0.05$). **Conclusion** Niaoduqing prevent renal disease progression in early stage by downregulating the expression of TGF- $\beta 1$ and FN, and inhibit infiltration of inflammatory cell, transdifferentiation of renal tubule cell, extra-cellular matrix accumulation and interstitial fibrosis.

[Keywords] Niaoduqing granule; renal interstitial fibrosis; TGF- $\beta 1$; unilateral ureteral obstruction

[收稿日期] 2016-06-09

[基金项目] 广东省中医药局资助项目(20131272)。

[作者简介] 陈琇萌,女,副主任医师,研究方向:慢性肾脏病诊治。

[通讯作者] *俞小敏,女,主任医师, E-mail: yxm.s@126.com。

肾间质纤维化是各种原因的慢性肾脏病进展至终末期肾病的共同病理过程。肾功能的恶化,很大程度上取决于肾小管间质纤维化的程度。单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型是以进行性小管间质纤维化为特征的实验性肾病模型,为目前常用的肾间质纤维化模型^[1]。目前研究认为,肾小管上皮细胞间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促使肾间质纤维化,而EMT受多种细胞因子、生长因子和激素的调节,其中转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)是最重要的促纤维化因子,主要通过诱导其下游因子表达,启动并调节EMT的全过程,使细胞外基质显著增多。纤连蛋白(FN)是构成细胞外基质(ECM)的一种重要成分。ECM合成增多、降解减少,进而过度沉积导致了肾间质的纤维化^[2-3]。尿毒清胶囊主要成分是大黄、黄芪、丹参、苦参、白术、茯苓、白芍、制何首乌、丹参、车前草等,是经过多年临床验证对慢性肾功能衰竭患者具有良好疗效的纯中药制剂。本研究通过建立UUO大鼠肾间质纤维化模型,动态观察肾脏间质纤维化的病理改变过程及尿毒清对该过程的影响,探讨尿毒清抗肾脏间质纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

尿毒清颗粒(规格:5g)购自内蒙古康臣药业(批号20130704);10周龄SPF级雄性大鼠60只,200~250 g,广东省医学实验动物中心提供,许可证:SYXK(粤)2010-0104;兔抗大鼠TGF- $\beta 1$ 、FN抗体购自Santa Cruz公司(批号sc-62839),GDPDH抗体购自Bioss公司,TGF- $\beta 1$ ELISA试剂盒购自深圳晶美公司。主要仪器有:病理图像分析系统(Kodak公司)、电泳仪(Amersham公司)、酶标仪(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立 实验鼠随机分为假手术组(Sham, $n=20$)、模型(UUO, $n=20$)和模型+治疗组(UNQ, $n=20$)。所有大鼠在SPF级实验室7 d适应。10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔麻醉,仰卧腹部正中切口2.5~3.5 cm,钝性分离暴露左侧肾盂输尿管连接部,在其下方1 cm处游离5 mm输尿管,用4-0线沿上端结扎两道,在两结扎点之间剪

断输尿管,然后逐层缝合,制备UUO模型。假手术组仅游离左侧输尿管但不结扎。

1.2.2 数据收集 尿毒清按55~65 kg成人量15 g/d,折算尿毒清为0.23~0.27 g/(kg·d),大鼠为人体剂量的9~10倍给药,配成1.0 g/mL药液,分上午、下午两次给药。UNQ组于术前1天予尿毒清2 g/(kg·d)灌胃,Sham组及UUO组每天灌胃等量生理盐水,各组分别于术后3、7、14 d下午处死5只大鼠。切除左肾,冷盐水洗净,留取肾门处横断面组织,用于免疫组化染色;剩余肾组织迅速置液氮保存备用。

1.3 检测方法

1.3.1 肾脏组织病理学检查及评分 肾组织予HE和Masson染色,随机选取互不重叠10个视野400倍显微镜下观察,按下列标准对肾脏病理改变进行评分:肾间质细胞浸润评分(cell infiltration score, CIS):无间质细胞浸润为0分、局灶细胞浸润1分、多灶细胞浸润2分、弥漫细胞浸润3分;包括肾小管萎缩和间质纤维化的慢性病变评分(atrophy and fibrosis score, AFS):按病变面积占该视野的百分比计算,间质纤维化:无计0分、小于25%计1分、25%~50%计2分、大于50%计3分;肾小管萎缩:无计0分、小于25%计1分、25%~50%计2分、大于50%计3分。肾小管间质损伤程度由各评分均值表示。

1.3.2 免疫组织化学染色 TGF- $\beta 1$:石蜡切片大鼠肾组织3 μ m厚脱蜡水化后,用0.3%过氧化氢-甲醇灭酶,微波修复,再用2%牛血清蛋白封闭20 min后加抗TGF- $\beta 1$ 抗体(1:200)4 $^{\circ}$ C过夜;再加生物素标记二抗(1:200)37 $^{\circ}$ C 30 min、辣根酶标记链酶卵白素(1:200)37 $^{\circ}$ C 30 min,最后DAB显色。阴性对照用PBS代替一抗。FN应用胃蛋白酶修复后,其染色步骤与TGF- $\beta 1$ 相似,使用的抗纤连蛋白抗体浓度为1:50。

1.3.3 ELISA分析TGF- $\beta 1$ 表达 取出液氮中的肾组织放入RIPA缓冲液中,再冰上研磨直至组织完全溶解;在4 $^{\circ}$ C中孵育60 min后在同一温度下14 000 $\times$ g离心30 min;取出上清液,组织匀浆中的蛋白质浓度和TGF- $\beta 1$ 浓度分别用劳马斯亮蓝法和ELISA法测定,校正用样品中的总蛋白浓度,TGF- $\beta 1$ 水平用ng/g蛋白表示。

1.3.4 WesternBlot分析FN表达 方法参照参考文献

献[4],将上述肾组织匀浆煮沸变性后按 200 mg 蛋白/孔上样,使用 7.5%SDS-PAGE 胶电泳后转膜,5%脱脂牛奶封闭,加入抗纤连蛋白抗体和抗 GAPDH 抗体(1:1 000)过夜,最后用辣根酶标记二抗(1:5 000)显影,以 GAPDH 作为内参照。分析纤连蛋白及 GAPDH 电泳条带曝光强度使用图像分析软件,用对应相对丰度的比值表示纤连蛋白表达。

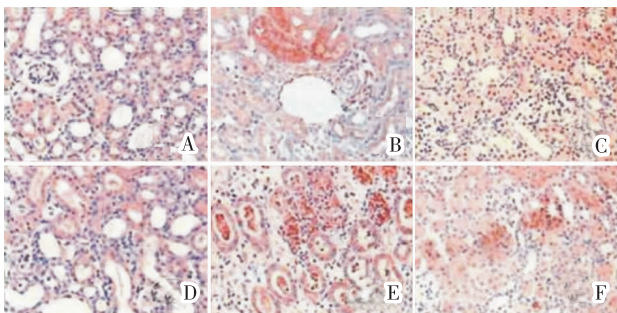
1.4 统计学处理

结果用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 SPSS 11.5 软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

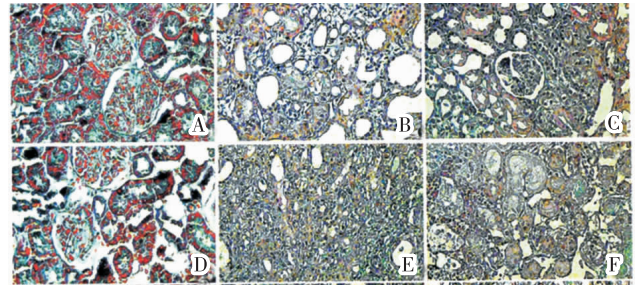
2.1 尿毒清对肾脏组织病理变化的影响

光镜下(图 1-2),Sham 组空泡变性在肾小管上皮细胞偶见,肾间质有单核细胞灶状浸润。UUO 组在造模后第 3 天出现扩张的肾小管及空泡变性的小管上皮细胞;肾间质可见水肿及多个灶状的细胞浸润和增生的梭形核细胞,肾间质有轻微纤维化改变。第 7 天时扩张的肾小管及空泡变性的小管上皮细胞更明显,肾间质出现水肿、细胞呈弥漫性增生并有局灶的纤维化。第 14 天肾小管上皮细胞出现弥漫萎缩,肾间质可见细胞浸润减轻而成纤维细胞明显增生,肾间质出现明显的纤维化;但肾小球均则未见明显病变。与 UUO 组比较,尿毒清治疗后肾组织形态学变化均明显减轻但依然存在;UNQ 组第 3 天 CIS 和 AFS 分别减少 33.5%和 41.9%($P<0.05$);第 7 天时 CIS 和 AFS 分别下降 26.2%和 20.83%($P<0.05$);在第 14 天时 CIS 和 AFS 分别下降 22.2%和 19.1%($P<0.05$) (表 1-2)。



注:A.Sham 组 7 d;B.UUO 组 7 d;C.UNQ 组 7 d;D.Sham 组 14 d;E.UUO 组 14 d;F.UNQ 组 14 d。

图 1 假手术组、模型组和尿毒清治疗组 7、14 d 肾间质纤维化改变(HE 染色,×200)



注:A.Sham 组 7 d;B.UUO 组 7 d;C.UNQ 组 7 d;D.Sham 组 14 d;E.UUO 组 14 d;F.UNQ 组 14 d。

图 2 假手术组、模型组和尿毒清治疗组 7、14 d 肾间质纤维化改变(Masson 染色,×200)

表 1 各组大鼠肾间质细胞浸润评分 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	3 d	7 d	14 d	F	P
Sham	0.10±0.23	0.15±0.18*	0.10±0.11**	23.526	0.012
UUO	1.86±0.42 [△]	2.01±0.44 ^{△*}	3.03±0.34 ^{△**}	15.127	0.00
UNQ	1.24±0.28 ^{△▲}	1.48±0.32 ^{△▲*}	2.34±0.26 ^{△▲**}	10.207	0.017
F	18.89	25.9	22.62		
P	0.00	0.00	0.00		

注:与 Sham 组比较[△] $P<0.01$;与 UUO 组比较[▲] $P<0.05$;与 3 d 组比较[★] $P<0.05$;与 7 d 组比较[#] $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠肾间质纤维化评分 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	3 d	7 d	14 d	F	P
Sham	0.00±0.00	0.10±0.09*	0.05±0.12**	34.21	0.015
UUO	1.34±0.28 [△]	3.56±0.23 ^{△*}	4.73±0.15 ^{△**}	50.84	0.00
UNQ	0.78±0.16 ^{△▲}	2.81±0.18 ^{△▲*}	3.85±0.12 ^{△▲**}	45.26	0.00
F	21.35	30.12	35.49		
P	0.00	0.00	0.00		

注:与 Sham 组比较[△] $P<0.01$;与 UUO 组比较[▲] $P<0.05$;与 3 d 组比较[★] $P<0.05$;与 7 d 组比较[#] $P<0.05$ 。

2.2 尿毒清对肾组织 TGF-β1 表达的影响

如图 3 示,Sham 组可见 TGF-β1 偶见在肾小球微弱表达。UUO 组在造模后第 3 天就可见肾小管上皮细胞扩张,肾间质有少量散在的细胞浸润和 TGF-β1 高的表达,第 7 天时肾小管表达 TGF-β1 的数量明显增多,TGF-β1 表达的强度也明显增高;到第 14 天 TGF-β1 表达仍继续增高。在 UNQ 组,第 3、7、14 天见肾小管上皮细胞扩张,细胞内散在表达 TGF-β1 且强度较低,肾间质偶见单核细胞浸润。肾组织匀浆中的 TGF-β1 蛋白水平用 ELISA 方法测定,结果发现(表 3),Sham 组 TGF-β1 水平在各时间点比较一致。UUO 组的 TGF-β1 在第 3 天开始就

和 Sham 组有差异,第 7、14 天表现为逐渐增高($P<0.05$),在第 3、7、14 天分别是同期 Sham 组的 1.81、2.35、2.62 倍 ($P<0.05$)。UNQ 组 TGF- β 1 水平表现为持续增高趋势,第 14 天时是 Sham 组的 1.81 倍 ($P<0.05$),但与 UUO 组比较 TGF- β 1 水平在各时间点都表现为降低,分别降低 48.1%、33.6%和 30.8% ($P<0.05$)。

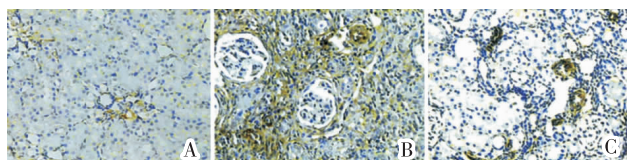


图 3 假手术组(A)、模型组(B)和尿毒清治疗组(C)14 d 时 TGF- β 1 表达(免疫组化 $\times 200$)

表 3 尿毒清对肾组织中 TGF- β 1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, ng/g)

组别	3 d	7 d	14 d	F	P
Sham	96.6 $\pm$ 40.35	88.52 $\pm$ 50.33	92.51 $\pm$ 20.52		
UUO	174.82 $\pm$ 50.15 Δ	208.02 $\pm$ 59.25 Δ	242.38 $\pm$ 62.45 Δ^*	28.85	0.00
UNQ	90.73 $\pm$ 25.65 $\blacktriangle$	138.12 $\pm$ 35.89 $\blacktriangle$	167.72 $\pm$ 31.72 $\blacktriangle\blacktriangle$	33.21	0.017
F	29.551	25.342	17.231		
P	0.000	0.000	0.000		

注:与 Sham 组比较 $\Delta P<0.01$;与 UUO 组比较 $\blacktriangle P<0.05$;与 7 d 组比较 $\blacktriangle\blacktriangle P<0.05$ 。

2.3 尿毒清对肾组织 FN 表达的影响

对 FN 的观察发现 (图 4):Sham 组肾间质 FN 的表达为偶发、散在,肾小球和肾小管基底膜则表达轻微。UUO 组 FN 主要表达在肾间质发生纤维化病变的区域,表达随时间延长而逐渐增强;FN 在 UNQ 组与 UUO 组表达的部位相似,但前者的表达量显著减少。肾脏组织匀浆用 Westernblot 检测 FN 表达的结果发现 (图 5),Sham 组未能检测到 FN 表达;UUO 和 UNQ 两组在第 3、7、14 天检测到 FN 的表达均比 Sham 组的高,其中与 UUO 组比较,UNQ 组在第 7、14 天 FN 的表达明显下降,分别为下降了 45%和 30% ($P<0.05$)。

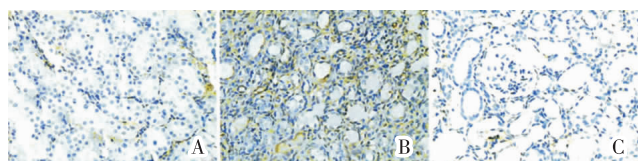
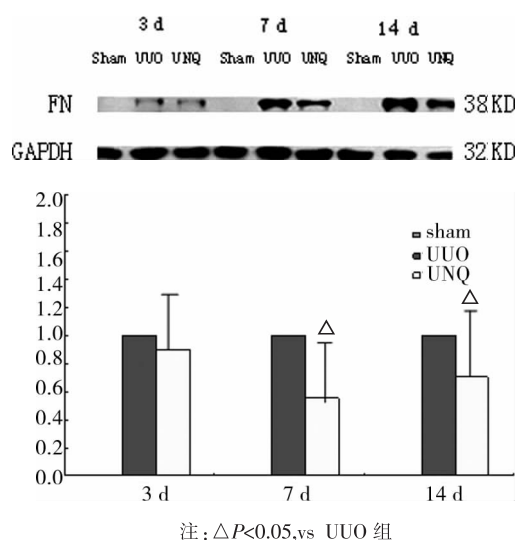


图 4 假手术组(A)、模型组(B)和尿毒清治疗组(C)14 d 时 FN 表达(免疫组化 $\times 200$)



注: $\Delta P<0.05$, vs UUO 组

图 5 Westernblot 分析 FN 在各组大鼠的表达电泳图(上)及柱形图(下)

3 讨论

尿毒清颗粒含大黄、黄芪,研究发现大黄、黄芪有拮抗大鼠肾小管上皮细胞转分化的作用^[5]。临床观察表明尿毒清颗粒有保护肾功能的作用。为探讨尿毒清在发病时究竟何时发挥保护作用以及其可能的主要作用点,我们在本实验中选用 UUO 大鼠模型进行了相关研究。UUO 模型被认为是理想的肾间质纤维化模型。尿路梗阻导致输尿管内压升高,肾脏有效血流明显减少,肾素-血管紧张素系统和肾间质内的单核巨噬细胞系统的活化,致使白细胞、单核细胞在肾组织里浸润,并释放出能够破坏肾系膜细胞、小管上皮细胞、间质成纤维细胞及结构的各种酶和因子,从而导致肾脏间质出现纤维化^[6-7]。另外,激活的单核巨噬细胞与同样激活的肾小管上皮细胞相互影响,导致肾组织 TGF- β 等激活^[8],与之相关的多种因子分泌升高,肾脏间质出现大量的炎症细胞,使得 ECM 的合成增加,肾脏间质纤维化发生;肾脏病理检查为小球大致正常而小管细胞表现为萎缩、间质表现为纤维化生^[6-7,9]。在本研究中,动态观察了 UUO 组造模后第 3、7、14 天的肾脏病理改变,发现造模后肾小管间质的受损呈进行性加重,到第 14 天显著地表现为肾小管细胞萎缩、肾间质纤维化生。上述一系列的改变跟文献报告的 UUO 模型病变特点一致。经尿毒清治疗后,镜下检查可见,肾间质炎症细胞明显减少,同时肾小管细胞萎缩和间质纤维化生程度也显著减轻。本研究提示尿毒清的肾脏保护作用,在肾脏纤维化病变的发生过程中持续存在,且

在该变化之前就已开始减轻肾组织的炎症反应。TGF- β 1 是由浸润到肾脏局部的单核巨噬细胞以及肾脏活化的固有细胞分泌,是致使 ECM 合成的细胞因子,在致病因素作用下会过度表达,从而使肾间质纤维化的发生。研究证实,TGF- β 1 除了可以激活间质成纤维细胞外,还通过 Smad 蛋白家族传递信号,从而增加 ECM 如 FN 的合成^[10]。有文献报道,UUO 制模 10 h,就可以在梗阻侧的肾脏检测到 TGF- β 1mRNA 开始增加,随后 TGF- β 1mRNA 仍一直升高^[11]。本研究发现,与 UUO 组比较,UNQ 组造模后第 3 天就可见肾间质炎症细胞的浸润减少,TGF- β 1 表达因受到抑制而减少,在第 7 天及第 14 天该作用持续存在;从第 7 天开始 FN 表达显著下降,到第 14 天该表现仍持续存在,提示在梗阻性肾病的发展过程中尿毒清可能通过抑制 EMT 合成,或者下调 TGF- β 1 表达从而减轻肾间质纤维化。

综上所述,在 UUO 模型中,尿毒清在病变开始就通过减轻炎症反应和减少 TGF- β 1 分泌而使转分化的肾脏细胞减少,最后肾间质纤维化减轻,从而发挥其肾脏保护作用,该作用的高峰时间是在造模后 7 天。这些结果提示,今后研究尿毒清的肾脏保护作用机制可能应把重点放在发病的早期。

参考文献:

- [1] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(5): F861-875.
- [2] Yang J, Shultz RW, Mars WM, et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [J]. *J Clin Invest*. 2002, 110(10): 1525-1538.
- [3] Stevens VA, Saad S, Chen XM, et al. The interdependence of EGF-R and SGK-L in fibronectin expression in primary kidney cortical fibroblast cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(5): 1047-54.
- [4] 张瑞芳,万建新,许艳芳.中药抗肾小管上皮细胞间充质转分化的研究进展[J].*中国中西医结合肾病杂志*,2011,12(4):368-371.
- [5] 陈 聪,吴勇军,喻 嵘,等.左归降糖益肾方含药血浆对高糖培养小鼠足细胞凋亡及 Caspase-12 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2015,35(3):1-4.
- [6] Chevalier RL. Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy[J]. *Pediatr Nephrol*, 1999, 13(7): 612-619.
- [7] Wen JG, Frøkier J, Jørgensen TM, et al. Obstructive nephropathy: An update of the experimental research [J]. *Urol Res*, 1999, 27(1): 29-39.
- [8] Zhang XL, Selbi W, de la Motte C, et al. Renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor - β 1 generation and monocyte binding[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(3): 763-773.
- [9] Massagué J. How cells read TGF- β signals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000,1(3): 169-178.
- [10] Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002,13(1): 96-107.
- [11] Walton G, Buttyan R,Garcia-Montes E, et al. Renal growth factor expression during The early phase of experimental hydronephrosis[J]. *J Urol*, 1992, 148(2Pt2): 510-514.

(本文编辑 杨 瑛)