

·实验研究·

本文引用: 蔡亚宏, 刘林券, 冯进, 蔡喆燧, 陈娟, 李莎, 熊丹. 六味地黄汤调控 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白表达对肾间质纤维化的影响研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1145-1151.

## 六味地黄汤调控 TGF- $\beta$ 及 Smad 家族蛋白表达 对肾间质纤维化的影响研究

蔡亚宏, 刘林券, 冯进, 蔡喆燧, 陈娟, 李莎, 熊丹\*

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

**[摘要]** **目的** 探究六味地黄汤抑制肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)的干预作用及机制。**方法** 将 30 只 SPF 级 SD 大鼠随机均分为假手术组、模型组、阳性药物组、中药高剂量组和中药低剂量组, 每组 6 只。除假手术组外, 其余各组采用左侧输尿管结扎术制备 RIF 模型。造模结束后, 假手术组和模型组予以蒸馏水灌胃, 阳性药物组予以醋酸泼尼松片 0.2 mg/kg 灌胃, 中药低、高剂量组分别予以六味地黄汤 0.5、1 mg/kg 灌胃, 疗程为 21 d。治疗结束后, 采用 HE 染色法评估肾间质损伤, Masson 染色法检测肾间质胶原蛋白沉积和纤维化, RT-PCR 测定肾间质转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、针对半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 2 的重组母体(recombinant mothers against decapentaplegic homolog 2, Smad2)、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达, Western blot 测定肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组的病理呈现系膜增生、间质增宽、胶原蛋白大面积沉积和明显纤维化, 且 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 和蛋白表达均增加( $P<0.05$ )。与模型组相比, 阳性药物组和中药低、高剂量组的病理表现均减轻, 且 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 和蛋白表达均降低( $P<0.05$ )。与中药低剂量组相比, 阳性药物组和中药高剂量组的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 和蛋白表达均降低( $P<0.05$ )。**结论** 六味地黄汤能够减轻 RIF 大鼠的肾间质纤维化程度, 且高剂量效果更佳, 其机制可能与调控 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白表达有关。

**[关键词]** 六味地黄汤; 肾间质纤维化; 终末期肾病; 肾间质损伤; TGF- $\beta$ ; Smad 家族蛋白

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.07.001

## Effects of Liuwei Dihuang Decoction on renal interstitial fibrosis by regulating the expressions of TGF- $\beta$ and Smad family proteins

CAI Yahong, LIU Linqun, FENG Jin, CAI Zheyi, CHEN Juan, LI Sha, XIONG Dan\*

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the intervention effects and mechanism of Liuwei Dihuang Decoction (LWDHD) on inhibiting renal interstitial fibrosis (RIF). **Methods** A total of 30 SPF SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, positive drug group, high- and low-dose Chinese medicines groups, with six rats in each group. Except for the sham-operated group, all other groups were prepared with left ureteral ligation to establish RIF models. After modeling, the sham-

**[收稿日期]** 2024-01-09

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4474); 湖南省卫生健康委员会科研计划项目(D202314018599, W20243021); 湖南中医药大学学院联合基金项目(2023XYLH044)。

**[通信作者]** \*熊丹, 女, 博士, 副主任医师, E-mail: xiongdan818@163.com。

operated group and model group were given distilled water by gavage, the positive drug group was given acetic acid prednisone tablets 0.2 mg/kg by gavage, and the high- and low-dose Chinese medicines groups were given LWDHD 1 mg/kg and 0.5 mg/kg by gavage, respectively, for a treatment course of 21 d. After treatment, renal interstitial injury was evaluated by HE staining, and renal interstitial collagen deposition and fibrosis were measured by Masson staining. The mRNA expressions of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), recombinant mothers against decapentaplegic homolog 2 (Smad2), Smad3, and Smad7 were determined by RT-PCR. The protein expressions of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 in the renal interstitium were determined by Western blot.

**Results** Compared with the sham-operated group, the model group exhibited pathological features of mesangial proliferation, interstitial widening, and extensive collagen deposition and obvious fibrosis, as well as elevated mRNA and protein expressions of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the positive drug group, low- and high-dose Chinese medicines groups showed alleviated pathological changes, as well as a decrease in the mRNA and protein expressions of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 ( $P<0.05$ ). Compared with the low-dose Chinese medicines group, the mRNA and protein expressions of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 in the positive drug group and the high-dose Chinese medicines group decreased ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** LWDHD can reduce renal interstitial fibrosis in RIF rats, with higher doses exhibiting more pronounced effects. The mechanism may be related to the regulation of TGF- $\beta$ 1 and Smad family protein expression.

[**Keywords**] Liuwei Dihuang Decoction; renal interstitial fibrosis; end-stage renal disease; renal interstitial injury; TGF- $\beta$ ; Smad family protein

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是临床常见的肾脏疾病,也是终末期肾病(endstage renal disease, ESRD)的首要原因<sup>[1]</sup>。随着生活节奏加快和饮食结构改变,CKD患病人数呈逐年增加趋势<sup>[2]</sup>。肾小球硬化和肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是CKD向ESRD进展的特征性病理改变<sup>[3]</sup>,RIF更是CKD患者肾功能丧失最为显著的病理机制<sup>[4]</sup>。因此,CKD临床治疗的关键是减缓或逆转RIF进展<sup>[5]</sup>。然而,由于缺乏规范化的治疗方案和理想的治疗药物,CKD的治疗并不乐观,其预后往往较差<sup>[2]</sup>。临床亟须一种能够减缓或逆转RIF进展的新型治疗策略,因此,探索RIF的相关靶点和新型药物是现阶段CKD研究的重点与热点。

RIF归属于中医学“水肿”“腰痛”“癃闭”“虚劳”等范畴<sup>[6]</sup>。中医理论认为,肾阴亏虚、湿浊阻滞是贯穿RIF全程的核心病机,临证用药当以滋补肾阴、利湿泄浊为基本治则<sup>[7]</sup>,方用六味地黄汤加减。六味地黄汤在多年的临床实践中展现出了可观的疗效和安全性,但尚不明确其作用机制<sup>[8-9]</sup>。转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )及Smad家族蛋白调控的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢及肌成纤维细胞生成是RIF的重要环节,这可能是六味地黄汤抑制RIF进展的潜在机制<sup>[10]</sup>。因此,

该研究以TGF- $\beta$ 及Smad家族蛋白调控作用为切入点,探究六味地黄汤治疗RIF的作用效果和内在机制,旨在为六味地黄汤在临床应用提供循证证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

50只健康SPF级SD大鼠雌雄各半,6~7周龄,体质量180~200g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(湘)2013-0004,合格证号:43004700024725。50只SD大鼠被随机分为假手术组、模型组、阳性药物组和中药高、低剂量组,每组10只。进行实验前予以7d适应性喂养,自由摄食与饮水,实验全程按照动物伦理学标准进行(湖南中医药大学第一附属医院动物伦理批准号:2020JJA140143)。

### 1.2 实验药物

六味地黄汤中药材购于湖南中医药大学第一附属医院中药房,使用剂量参考课题组前期研究<sup>[11]</sup>,具体药物组成为:熟地黄24g,山茱萸12g,干山药12g,泽泻12g,茯苓9g,牡丹皮6g。上述中药材经纯净水浸泡1h后由本院制剂室根据人等效剂量进行水煎浓缩为浸膏剂,使其终浓度为1.0g/mL,置于常温下阴凉处储存。醋酸泼尼松片(山东鲁抗医药

集团赛特有限责任公司生产,国药准字H20033023),规格:5 mg/片,批号:20220912)。

### 1.3 主要试剂与仪器

TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:20230407、20230211、20230510、20230313;PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司,批号:BS20230519)。

光学显微镜(日本奥林匹斯公司,型号:8344-II);荧光 PCR 板(美国赛默飞世尔科技公司,型号:66347-A);电动摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:IX73);转膜仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号:XIII-23)。

### 1.4 RIF 大鼠模型的建立

参考 RIF 动物模型经典制备方法<sup>[12]</sup>,具体为:大鼠适应性饲养 7 d 后,术前禁食不禁水 1 d,使用 0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 SD 大鼠;待麻醉成功后,脱毛机除去左肾腹腰部肾区鼠毛,用聚维酮碘消毒皮肤 3 遍,铺上无菌手术巾,在左侧肾区切口;暴露肾脏,切除 5/6 肾,沿肾脏肾门找到半透明输尿管,钝镊分离,将分离出的输尿管两端用 4 号线结扎,之后纳于原位;逐一缝合切口,伤口消毒,连续 3 d 腹腔注射青霉素注射液 0.8 万 U/kg 预防感染;造模后第 7 天随机选取 3 只大鼠取肾脏组织行 HE 染色,见肾间质炎症、肾小管扩张、上皮细胞空泡化,即视为造模成功。假手术组:大鼠打开腹腔后分离左侧输尿管但不结扎,然后逐层缝合切口关闭腹腔,具体操作同前。

### 1.5 动物给药

各组均于造模后第 2 天开始给药。假手术组与模型组大鼠予以蒸馏水按照 2 mL/100 g 体质量灌胃。阳性药物组予醋酸泼尼松片人等效剂量(0.2 mg/kg)溶液按照 2 mL/100 g 灌胃。给药剂量按照成年人体质量 60 kg 每天 30 mL 计算,经体表面积折算,中药低、高剂量组分别予以浓度 0.5、1 mL/kg 的等剂量溶液按照 2 mL/100 g 灌胃。以上各组每天灌胃 1 次,参照前期研究<sup>[12]</sup>给药时间均连续给药 8 周。

### 1.6 取材方法

药物干预结束后,断颈处死大鼠,将左侧肾组织行冠状切面;一部分浸入 10%中性福尔马林中固定

48 h;用于行 HE 及 Masson 染色检查;另一部分立即置于-80 °C 冰箱,用于行 Western blot 及 RT-PCR 测定。

### 1.7 指标检测

1.7.1 HE 染色观察大鼠肾脏组织形态与病理 完整取出各组大鼠的肾脏组织进行形态观察;将左侧肾组织行冠状切面,一部分浸入 10%中性福尔马林中固定 48 h,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,行 HE 染色进行病理观察。

1.7.2 Masson 染色观察肾间质胶原蛋白沉积及纤维化情况 取材及石蜡包埋按“1.7.1”步骤进行,并通过观察 Masson 染色切片考察肾间质胶原蛋白沉积及纤维化情况,蓝色为胶原纤维着色。

1.7.3 RT-PCR 检测肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达 镜下筛选肾间质,根据 TRIzol 说明书提取各组大鼠肾间质组织进行总 RNA 提取,提取大鼠肾间质总 RNA,逆转录为 cDNA,特异性扩增 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7,使用  $\beta$ -actin 为内参。反应条件为 95 °C,10 min 变性;95 °C,15 s;60 °C,60 s;40 次循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算各蛋白的 mRNA 表达量,引物序列详见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列  
Table 1 RT-PCR primer sequences

基因	引物序列	引物长度/bp
TGF- $\beta$ 1	正向:5-CAACGGTGGACTACCCCGATGACA-3	18
	反向:5-CCTGAACGGCTTTGGTGAGGTTGA-3	
Smad2	正向:5-CAGGCAGTACATGCTAAGAATT-3	22
	反向:5-TATCCATGGTTTTGTCCCGCAG-3	
Smad3	正向:5-ACVATGAAGTGGTGAAGTTC-3	25
	反向:5-CAGATGTCAGGGTCTCAA-3	
Smad7	正向:5-CCTAATGGACCTCTATGCCTT-3	19
	反向:5-CCTAACTTTGCTGATCCACGA-3	
$\beta$ -actin	正向:5-GCTGTGCTATGTTGCTCTAG-3	22
	反向:5-CGCTCGTTGCCAATAGTG-3	

1.7.4 Western blot 检测肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达 取肾脏组织,提取组织总蛋白,经凝胶电泳后将蛋白置于 PVDF 膜,5%脱

脂奶粉完全封闭孵育 60 min, 添加一抗抗体, 4 ℃ 环境下静置 12 h, 弃去一抗, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。室温孵育二抗 2 h, 洗涤后弃去二抗, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。显色后以  $\beta$ -actin 作为内参, 计算各蛋白的灰度比值。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析。本研究数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”描述, 均进行正态分布以及方差齐性检验, 组间比较满足正态性者, 采用单因素方差分析, 方差齐时选择 LSD 法, 方差不齐采用 Tamhanes' T2 法, 非正态分布采用秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠的肾脏形态

研究期间无大鼠死亡。观察各组大鼠肾脏形态, 可见: 假手术组大鼠左肾脏形态完整, 色泽红润且表面光滑; 模型组大鼠左肾体积明显增大, 表面颗粒化

严重, 颜色灰白且缺血, 剖开后可见肾内有大量积液滞留, 肾皮质明显变薄, 皮髓质界限不清晰; 阳性药物组和中药低、高剂量组大鼠左肾改变相对模型组较轻, 但肾表面仍呈现缺血状态。详见图 1。

### 2.2 各组大鼠肾脏的 HE、Masson 染色结果

HE 染色结果显示, 假手术组大鼠肾小球形态规则, 肾小管结构排列整齐, 无系膜增生, 间质正常, 未见炎性细胞浸润; 模型组大鼠可见系膜增生, 肾小管扩张或萎缩, 肾小球硬化且形态不规则, 球囊粘连, 间质增宽, 可见炎性细胞浸润; 阳性药物组和中药低、高剂量组大鼠肾小管扩张或萎缩减轻, 炎性细胞减少, 病变减轻。详见图 2。

Masson 染色结果显示, 假手术组大鼠肾间质组织仅有少量胶原蛋白沉积, 未见肾间质纤维化, 胶原染色呈蓝色; 模型组大鼠肾间质组织有胶原蛋白大面积沉积, 存在明显的纤维化; 阳性药物组和中药低、高剂量组大鼠肾间质组织中胶原蛋白沉积及纤维化得到了不同程度的改善。详见图 2。

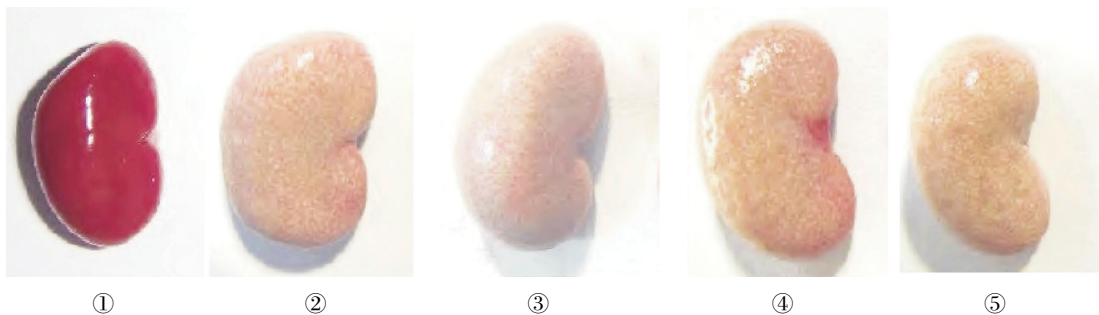


图 1 各组大鼠的肾脏形态

Fig.1 Renal morphology of rats in each group

注: ①假手术组; ②模型组; ③阳性药物组; ④中药低剂量组; ⑤中药高剂量组。

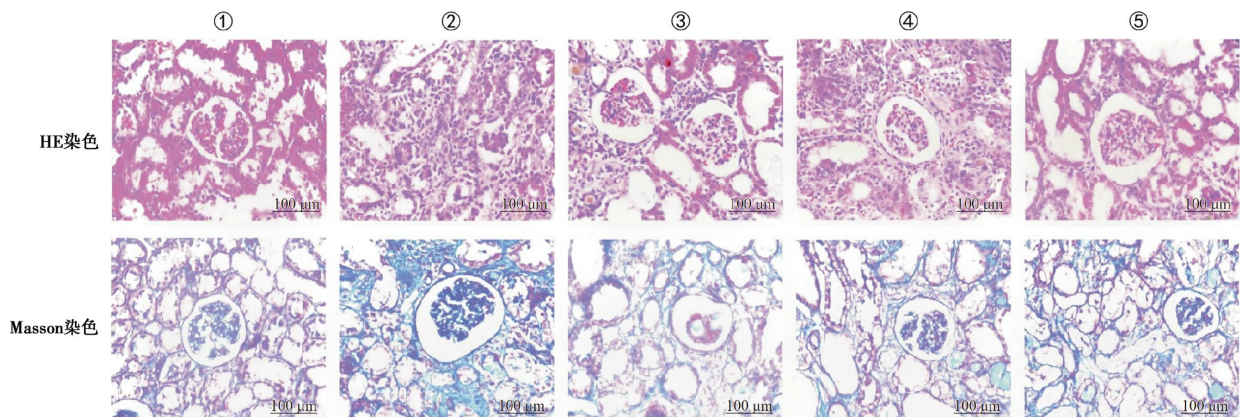


图 2 各组大鼠肾脏的 HE 染色及 Masson 染色结果( $\times 200$ )

Fig.2 HE staining and Masson staining results of kidney in each group of rats ( $\times 200$ )

注: ①假手术组; ②模型组; ③阳性药物组; ④中药低剂量组; ⑤中药高剂量组。

### 2.3 各组大鼠的肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达

与假手术组相比,模型组大鼠的肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达增加( $P<0.05$ );与模型组相比,阳性药物组和中药低、高剂量组大鼠的肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达降低( $P<0.05$ );与阳性药物组和中药高剂量组相比,中药低剂量组的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达均增加( $P<0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组大鼠肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达比较( $\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of mRNA expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 in the renal interstitium of rats in each group( $\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TGF- $\beta$ 1	Smad2	Smad3	Smad7
假手术组	10	0.32 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.08
模型组	10	1.43 $\pm$ 0.21 <sup>▲</sup>	1.26 $\pm$ 0.15 <sup>▲</sup>	0.93 $\pm$ 0.12 <sup>▲</sup>	1.17 $\pm$ 0.20 <sup>▲</sup>
阳性药物组	10	0.55 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>	0.58 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	0.42 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>	0.45 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>
中药低剂量组	10	0.73 $\pm$ 0.11 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	1.01 $\pm$ 0.13 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.86 $\pm$ 0.13 <sup>*<math>\Delta</math></sup>
中药高剂量组	10	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>*#</sup>	0.53 $\pm$ 0.11 <sup>*#</sup>	0.45 $\pm$ 0.11 <sup>*#</sup>	0.46 $\pm$ 0.14 <sup>*#</sup>

注:与假手术组比较,▲ $P<0.05$ ;与模型组相比较,\* $P<0.05$ ;与阳性药物组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$ ;与中药低剂量组比较,# $P<0.05$ 。

### 2.4 各组大鼠的肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达

与假手术组相比,模型组大鼠的肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达增加( $P<0.05$ );与模型组相比,阳性药物组、中药低剂量组、中药高剂量组大鼠的肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达降低( $P<0.05$ );与阳性药物组和中药高剂量组相比,中药低剂量组的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达均增加( $P<0.05$ )。详见表 3、图 3。

## 3 讨论

RIF 归属于中医学“水肿”“腰痛”“癃闭”“虚劳”等范畴<sup>[6]</sup>,肾阴亏虚、湿浊阻滞是贯穿其全程的核心病机<sup>[7]</sup>。一方面,肾阴亏虚是指肾脏本身的阴液不足,导致机体失去平衡。肾脏是主要的生殖和排泄器官,同时也是人体的先天之根,其为人体提供精、

表 3 各组大鼠肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的蛋白表达比较( $\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of protein expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 in the renal interstitium of rats in each group ( $\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TGF- $\beta$ 1	Smad2	Smad3	Smad7
假手术组	10	0.25 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04
模型组	10	0.62 $\pm$ 0.07 <sup>▲</sup>	1.12 $\pm$ 0.14 <sup>▲</sup>	0.89 $\pm$ 0.09 <sup>▲</sup>	0.87 $\pm$ 0.07 <sup>▲</sup>
阳性药物组	10	0.36 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	0.54 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	0.40 $\pm$ 0.12 <sup>*</sup>	0.32 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>
中药低剂量组	10	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.97 $\pm$ 0.12 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>*<math>\Delta</math></sup>	0.51 $\pm$ 0.04 <sup>*<math>\Delta</math></sup>
中药高剂量组	10	0.36 $\pm$ 0.05 <sup>*#</sup>	0.55 $\pm$ 0.08 <sup>*#</sup>	0.42 $\pm$ 0.09 <sup>*#</sup>	0.35 $\pm$ 0.05 <sup>*#</sup>

注:与假手术组比较,▲ $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与阳性药物组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$ ;与中药低剂量组比较,# $P<0.05$ 。

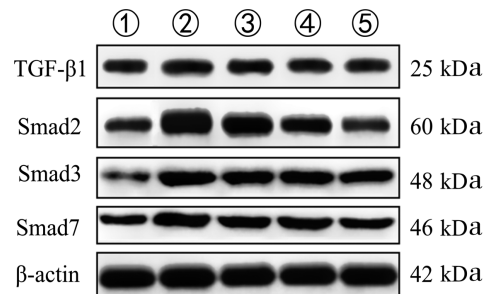


图 3 各组大鼠肾间质 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 条带图  
Fig.3 Bands of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, and Smad7 in the renal interstitium of rats in each group

注:①假手术组;②模型组;③中药低剂量组;④中药高剂量组;⑤阳性药物组。

血、津、液,掌管生长发育、繁衍后代等重要功能。肾阴亏虚会影响肾脏的正常功能,导致肾脏不能正常调节水分代谢,进而引起肾间质的水肿和纤维化。另一方面,湿浊阻滞是指机体内湿气和毒素积聚,阻塞了气血的正常循环。湿邪可以从外部进入,也可以由内部产生,主要表现为水肿、厌油、黏腻、困倦等症状。湿邪阻滞经络,使得气血运行不畅,进而导致肾间质的水肿和纤维化。因此,临证用药需以滋补肾阴、利湿泄浊立法,方用六味地黄汤加减。方中,熟地黄甘温,有补肾填精、滋阴养血之用,为治肾阴虚之要药;山茱萸甘温,有滋补肝肾、固摄肾精之功;山药甘平,有平补肺脾肾气阴之效。三药合用,共填肾精,以养元阴。茯苓淡平,利水渗湿、健脾宁心;泽泻淡寒,利湿泄浊,兼以泻热;牡丹皮苦寒,活血祛瘀、以泻浊瘀。三药合用,共泄湿浊,以除留邪。上六味合

用,共为滋补肾阴、利湿泄浊之用,使肾阴得养、湿浊得除,则 RIF 向愈。因此,六味地黄汤的理法方药与 RIF 的中医病机相契合,是一种治疗 RIF 的潜在策略。本研究结果显示,经左侧输尿管结扎术的大鼠出现了典型的 RIF 病理表现,呈现出系膜增生、间质增宽、胶原蛋白大面积沉积和明显的纤维化,提示 RIF 模型制备成功。与模型组相比,六味地黄汤中药低、高剂量组的 RIF 病理改变显著减轻,表明六味地黄汤具有减轻 RIF 进展的潜力。

RIF 是现阶段的临床难题,其受多个因素如氧化应激、炎症反应、血管生成、细胞外基质沉积、成纤维细胞及结缔组织增生、瘢痕形成等的影响<sup>[12]</sup>。RIF 形成机制较为复杂,其具体机制尚未完全阐明。董翔等<sup>[13]</sup>研究发现,RIF 多数与 ECM 合成增多或降解减少密切相关。ZHU 等<sup>[14]</sup>研究显示,CKD 患者的肾小管上皮细胞能够表达肌成纤维细胞的特征性标志物  $\alpha$ -平滑肌动蛋白,并且肾小管上皮细胞能够在特定条件下转化为肌成纤维细胞。相关研究表明,CKD 患者的肾小管上皮细胞发生上皮-间质细胞转分化是 RIF 发生的关键生物学过程,而该过程与 TGF- $\beta$ 1 存在极为密切的联系<sup>[15-16]</sup>。目前的研究普遍认为,TGF- $\beta$ 1 是诱发纤维细胞产生胶原、纤维连接蛋白和糖蛋白的最重要的蛋白之一,早期实验研究也证实,TGF- $\beta$ 1 是 RIF 发生和发展过程中的关键蛋白<sup>[17]</sup>。在本研究中,六味地黄汤可明显抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达水平,从而改善 RIF 的进展。此外,HEBERT 等<sup>[18]</sup>研究发现,TGF- $\beta$ 1 通过激活其下游信号分子 Smad2/3,抑制 Smad7 来实现其调节肾纤维化的生物学效应。PARKER 等<sup>[19]</sup>研究表明,Smad 可通过 TGF- $\beta$  途径加速 RIF 的发生发展,在各种因素的作用下激活 Smad 蛋白,直接或间接激活 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白。Smad7 是 RIF 的双刃剑,一方面其活化可加速 RIF 的发生<sup>[20]</sup>,另一方面其过表达又可阻断 Smad2/3 活化,进而缓解各种促纤维化因素所致的 RIF<sup>[21]</sup>。因此,TGF- $\beta$ 1 及 Smad 家族蛋白与 RIF 的发生和发展密切相关,该通路可能是 RIF 药物治疗的切入点。本研究结果显示,与假手术组相比,模型组的 TGF-

$\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 和蛋白表达显著增加,提示 RIF 的发生与 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白的激活有关。与模型组相比,六味地黄汤中药低、高剂量组的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 和蛋白表达显著降低,表明六味地黄汤具有抑制 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白表达的作用,这可能是其减轻 RIF 进展的机制。本研究结果证实,六味地黄汤通过调控 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白表达改善 RIF 预后的作用,为护理实践提供了新的思路和方法。一方面,六味地黄汤作为一种传统中药方剂,具有被广泛用于肾脏疾病临床治疗的潜力,这为医护提供了一个新的药物选择,可以结合现有的治疗方案,帮助 RIF 患者延缓疾病的发展并改善肾功能。另一方面,RIF 是一个复杂的生物学过程,涉及多个细胞和分子的相互作用,通过研究六味地黄汤调控 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白表达的机制,医护人员可以更好地理解肾间质纤维化的发生发展过程。这有助于护理人员提前识别患者的风险因素,并采取针对性的干预措施,以减缓纤维化的进展,保护患者的肾功能。此外,该研究也提醒护理人员注重中医药在肾病治疗中的潜力。六味地黄汤作为中药方剂,具有调节多个靶点的特点,可以综合调理机体的整体状态,从而对肾脏疾病产生综合效应。在临床实践中,护理人员可以与中医师密切合作,根据患者的具体情况,制定个性化的中西医结合治疗方案,以达到最佳的护理效果。

综上所述,六味地黄汤能够减轻 RIF 模型大鼠的肾间质纤维化程度,其机制可能与调控 TGF- $\beta$  及 Smad 家族蛋白有关。六味地黄汤可能是一种潜在的 RIF 治疗策略,未来需要有更多的研究探索六味地黄汤的临床应用价值。

## 参考文献

- [1] YAP D Y H, FONG C H Y, ZHANG X J, et al. Humoral and cellular immunity against different SARS-CoV-2 variants in patients with chronic kidney disease[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 19932.
- [2] AMMIRATI A. Chronic kidney disease[J]. *Revista da Associação*

- Médica Brasileira, 2020, 66: s03-s09.
- [3] CHARLES C, FERRIS A H. Chronic kidney disease[J]. Primary Care, 2020, 47(4): 585-595.
- [4] YANAI H, ADACHI H, HAKOSHIMA M, et al. Molecular biological and clinical understanding of the pathophysiology and treatments of hyperuricemia and its association with metabolic syndrome, cardiovascular diseases and chronic kidney disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17): 9221.
- [5] NEYRA J A, CHAWLA L S. Acute kidney disease to chronic kidney disease[J]. Critical Care Clinics, 2021, 37(2): 453-474.
- [6] 姚宁顺, 王庆胜, 米盼盼, 等. 基于“久病在络, 气血皆塞”理论论治慢性肾脏病肾间质纤维化[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(4): 652-655.
- [7] 黄诗琦, 姜晨. 六味地黄汤加味在肾间质纤维化患者中的应用进展[J]. 中国当代医药, 2023, 30(4): 44-47.
- [8] 武丽萍, 马华, 郝骞, 等. 基于数据挖掘及复杂网络分析的中医治疗肾间质纤维化证-药关系研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(10): 894-898, 944-945.
- [9] 李建省, 王英明, 闫燕顺, 等. “肾虚络瘀, 肾络癥瘕”病机观与肾间质纤维化中自噬不足的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 186-194.
- [10] 刘梦超, 王明哲, 肖遥, 等. 基于“肾络癥瘕”理论探讨肾炎防衰液治疗肾间质纤维化的药效物质基础与机制[J]. 中医药导报, 2021, 27(7): 158-164.
- [11] 王晖, 张海英, 高海波, 等. 六味地黄汤对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织  $\beta$ -catenin 及 EMT 的影响[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(12): 2385-2389.
- [12] 尹欣. 基于 Klotho/TGF- $\beta$ 1/Smad2 信号通路研究六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠模型抗纤维化的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [13] 董翔, 胡爽, 王茜, 等. 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠肾脏缺氧诱导因子-1 $\alpha$  及 Twist 和 E-cadherin 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(11): 927-934.
- [14] ZHU Z J, HU J J, CHEN Z W, et al. Transition of acute kidney injury to chronic kidney disease: Role of metabolic reprogramming[J]. Metabolism: Clinical and Experimental, 2022, 131: 155194.
- [15] HARADA R, HAMASAKI Y, OKUDA Y, et al. Epidemiology of pediatric chronic kidney disease/kidney failure: Learning from registries and cohort studies[J]. Pediatric Nephrology, 2022, 37(6): 1215-1229.
- [16] GEDDES R, AGUIAR J. Feline comorbidities: Balancing hyperthyroidism and concurrent chronic kidney disease[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2022, 24(7): 641-650.
- [17] AUGUST P. Chronic kidney disease: Another step forward[J]. New England Journal of Medicine, 2023, 388(2): 179-180.
- [18] HEBERT S A, IBRAHIM H N. Hypertension management in patients with chronic kidney disease[J]. Methodist DeBakey Cardiovascular Journal, 2022, 18(4): 41-49.
- [19] PARKER V J. Nutritional management for dogs and cats with chronic kidney disease[J]. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, 2021, 51(3): 685-710.
- [20] TSAI H J, WU P Y, HUANG J C, et al. Environmental pollution and chronic kidney disease[J]. International Journal of Medical Sciences, 2021, 18(5): 1121-1129.
- [21] HUSSEIN H, APETRII M, COVIC A. Health-related quality of life in patients with chronic kidney disease[J]. Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research, 2021, 21(1): 43-54.

(本文编辑 匡静之)