

本文引用: 江丽红, 姚 强, 罗 晨, 陆华冠, 王宇红, 刘建军. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨天芙止眩方改善自发性高血压大鼠肾纤维化的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 608–616.

基于 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨天芙止眩方改善自发性高血压大鼠肾纤维化的作用机制

江丽红, 姚 强, 罗 晨, 陆华冠, 王宇红, 刘建军*

湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 目的 基于转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad 信号通路探讨天芙止眩方对自发性高血压(SHR)大鼠肾纤维化和炎症的改善作用。方法 将 40 只 SHR 大鼠随机分为 5 组:模型组、厄贝沙坦组(13.5 mg/kg)及天芙止眩方高(5.94 g/kg)、中(2.97 g/kg)、低(1.49 g/kg)剂量组,每组 8 只;另取 8 只 WKY 大鼠作为正常组。模型组和正常组给予等体积蒸馏水。各组均连续灌胃给药 11 周,每天 1 次。分别在第 1、3、5、7、9、11 周测量大鼠尾动脉收缩压及舒张压。实验结束后,生化分析仪检测血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)含量;ELISA 法检测血清中血管紧张素 II(Ang II)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量;HE、Masson 及天狼星红染色检测肾组织病理变化和胶原纤维沉积;免疫组织化学染色法检测肾组织 I 型胶原(Collagen I)、III 型胶原(Collagen III)、TGF- β 1、CD68 蛋白表达;Western blot 法检测肾组织 CD68、TGF- β 1 蛋白表达及磷酸化细胞信号转导分子 2/3(p-Smad2/3)和细胞信号转导分子 2/3(Smad2/3)的蛋白比值;RT-qPCR 检测 Ang II、TGF- β 1、CD68 的 mRNA 表达。结果 与正常组比较,模型组 SHR 大鼠第 1、3、5、7、9、11 周收缩压和舒张压均升高($P<0.001$);血清 BUN、Scr、Ang II、IL-1 β 、TNF- α 水平升高($P<0.01$, $P<0.001$);肾组织出现病理损伤和炎症浸润,并形成明显的纤维化,Collagen I 和 Collagen III 的蛋白表达升高($P<0.001$),CD68、TGF- β 1、p-Smad2/3 和 Smad2/3 的蛋白比值及 Ang II、TGF- β 1、CD68 的 mRNA 水平均增高($P<0.01$, $P<0.001$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及天芙止眩方高、中剂量组第 3、5、7、9、11 周收缩压及舒张压均降低($P<0.01$),天芙止眩方低剂量组第 5、7、9、11 周收缩压及舒张压下降($P<0.05$, $P<0.01$);血清 BUN、Scr、Ang II、IL-1 β 、TNF- α 水平降低($P<0.05$, $P<0.01$);肾组织病理损伤明显改善,炎症浸润及纤维化减少,Collagen I、Collagen III 的蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),CD68、TGF- β 1、p-Smad2/3 和 Smad2/3 的蛋白比值及 Ang II、TGF- β 1、CD68 的 mRNA 水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 天芙止眩方治疗能有效降低 SHR 大鼠血压并改善高血压引起的肾纤维化,其机制可能与减少组织炎症,抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路有关。

〔关键词〕 高血压;天芙止眩方;肾纤维化;巨噬细胞;TGF- β 1/Smad 信号通路

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.004

Mechanism of Tianfu Zhixuan Formula in alleviating renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats based on the TGF- β 1/Smad signaling pathway

JIANG Lihong, YAO Qiang, LUO Chen, LU Huaguan, WANG Yuhong, LIU Jianjun*

Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the alleviative effects of Tianfu Zhixuan Formula (TFZXF) on renal fibrosis and inflammation in spontaneously hypertensive rats (SHR) based on the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smad signaling pathway.

〔收稿日期〕 2024-07-18

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2024JJ8158);湖南中医药大学科研创新基金项目(2023BKS146);湖南中医药大学研究生创新课题(2024CX078)。

〔通信作者〕 * 刘建军,男,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:liujianjun2018@hnucm.edu.cn。

Methods Forty SHR rats were randomly divided into five groups: a model group, an irbesartan group (13.5 mg/kg), and high- (5.94 g/kg), medium- (2.97 g/kg), and low- (1.49 g/kg) dose TFZXF groups, with eight rats in each group. Another eight WKY rats were used as the normal group. The model groups and the normal group were given an equal volume of distilled water. All groups were administered by gavage for 11 consecutive weeks, once a day. The systolic and diastolic blood pressures of the rats' tail artery were measured at weeks 1, 3, 5, 7, 9, and 11. After the experiment, the levels of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Scr) in the serum were measured by the biochemical analyzer. The levels of angiotensin II (Ang II), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum were measured by ELISA. The pathological changes and collagen fiber deposition in renal tissue were measured by HE, Masson, and Sirius red staining. The expressions of type I collagen (Collagen I), type III collagen (Collagen III), TGF- β 1, and CD68 proteins in renal tissue were measured by immunohistochemical staining. The protein expressions of CD68 and TGF- β 1 in renal tissue, as well as the protein ratios of phosphorylated cellular signal transduction molecules Smad2/3 (p-Smad2/3) to cellular signal transduction molecules 2/3 (Smad2/3), were measured by Western blot. And the mRNA expressions of Ang II, TGF- β 1, and CD68 were measured by RT-qPCR. **Results** Compared with the control group, the SHR rats in the model group showed increased systolic and diastolic blood pressure at weeks 1, 3, 5, 7, 9, and 11 ($P<0.001$). The levels of serum BUN, Scr, Ang II, IL-1 β , and TNF- α were higher ($P<0.01$, $P<0.001$). The renal tissue in the model group exhibited pathological damage, inflammatory infiltration, and significant fibrosis. The protein expressions of Collagen I and Collagen III increased ($P<0.001$). The protein expression levels of CD68 and TGF- β 1, the protein ratio of p-Smad2/3 and Smad2/3, as well as the mRNA levels of Ang II, TGF- β 1, and CD68, were all higher ($P<0.01$, $P<0.001$). Compared with the model group, the irbesartan group and the high- and medium-dose TFZXF groups showed decreased systolic and diastolic blood pressure at weeks 3, 5, 7, 9, and 11 ($P<0.01$). The low-dose TFZXF group showed decreased systolic and diastolic blood pressure at weeks 5, 7, 9, and 11 ($P<0.05$, $P<0.01$). The levels of serum BUN, Scr, Ang II, IL-1 β , and TNF- α decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The pathological damage in the renal tissue was significantly relieved, with reduced inflammatory infiltration and fibrosis. The protein expressions of Collagen I and Collagen III decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expression levels of CD68 and TGF- β 1, the protein ratio of p-Smad2/3 and Smad2/3, as well as the mRNA levels of Ang II, TGF- β 1, and CD68, were all lower ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Treatment with TFZXF can effectively reduce blood pressure and alleviate hypertension-induced renal fibrosis in SHR rats. The mechanism may be related to reducing tissue inflammation and inhibiting the TGF- β 1/Smad signaling pathway.

[**Keywords**] hypertension; Tianfu Zhixuan Formula; renal fibrosis; macrophages; TGF- β 1/Smad signaling pathway

高血压是心血管疾病潜在的危险因素,长期血压升高会对血管、心脏、肾脏等靶器官造成损伤^[1]。肾脏作为人体水钠调节的主要器官,对维持机体正常的血压起着重要的作用^[2-3]。研究表明,高血压与慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)密切相关,长期高血压可引起肾小球毛细血管损伤和肾小管间质炎症,进而形成肾纤维化,最终导致肾衰竭^[4]。肾纤维化的形成涉及炎症细胞浸润、促纤维化因子的分泌、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)聚集与降解失衡等多个环节,其中以 ECM 过度生成和沉积为主要特征^[5]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/Smad 信号调节 ECM 成分的生成,在 CKD 的肾小球和肾小管间质纤维化的发病中起关键作用^[6-7],以 TGF- β 1 为靶标阻止 CKD 纤维化已受到广泛关注^[8]。近期研究提示,减少肾纤维化、预防肾损伤可能是治疗高血压的有效策略,这为抗高血压新药的研发提供了新的思路^[9-10]。

半夏白术天麻汤是源于《医学心悟·眩晕》中的

经典方,治疗痰湿壅盛型高血压疗效确切^[11-12],天麻止眩方以半夏白术天麻汤为基础化裁,由天麻、钩藤、白术等中药组方而成,为湖南中医药大学第一附属医院王宇红研究员团队多年治疗原发性高血压的临床经验方,具有平肝息风、利湿化痰之功效。本研究以自发性高血压(spontaneously hypertensive rats, SHR)大鼠为模型,探讨天麻止眩方的降压和肾脏保护作用,以期为其临床应用提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SHR 大鼠 40 只,SPF 级,7 周龄,体质量 200~220 g;雄性 WKY 大鼠 8 只,SPF 级,7 周龄,体质量 200~220 g。大鼠均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2024-0001。所有动物均饲养于湖南中医药大学实验动物中心,温度(22 $\pm$ 2)℃,湿度 50% $\pm$ 5%,自由摄食饮水,昼夜循环 12 h。实验动物使用许可证号:

SYXK(湘)2019-0009,适应性喂养 1 周后开始实验。本研究已通过湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会审查,伦理批准号:LLBH-202309120004。

1.2 主要药物及试剂

天芩止眩方由天麻 15 g、钩藤 10 g、白术 10 g、法半夏 9 g、茯苓 6 g、陈皮 6 g、甘草 3 g 组成,原药材由湖南中医药大学第一附属医院提供,经王宇红研究员鉴定为正品,均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》^[13]的质量要求。全方蒸馏水提取,提取 2 次,第一次加 10 倍量水、煎煮 1.5 h,第二次加 8 倍量水、煎煮 1 h;合并两次提取液,最终浓缩至 0.594 g/mL 高剂量药液(以生药量计),用蒸馏水稀释成中、低剂量(0.297、0.149 g/mL)^[14]。厄贝沙坦胶囊(珠海润都制药股份有限公司,批号:3062204002,规格:0.15 g/粒)。

Masson 试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:CR2108024);改良天狼星红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1472);TGF- β 1、细胞信号转导分子 2/3 (mothers against decapentaplegic homolog 2/3, Smad2/3)、p-Smad2/3、CD68(美国 Affinity 公司,批号:AF1027、AF3367、AF6367、DF7518);I 型胶原(Collagen type I, Collagen I)、III 型胶原(Collagen type III, Collagen III)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:14695-1-AP、22734-1-AP);大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒、大鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA 试剂盒、大鼠血管紧张素 II(angiotensin, Ang II)ELISA 试剂盒(江莱生物公司,批号:JL13202、JL20884、JL11637);兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:PV-9001);磷酸化蛋白酶抑制剂 100X(赛文创新生物科技有限公司,批号:SW107-02);RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定液(北京博奥森生物技术有限公司,批号:C5029、C05-02001)。

1.3 主要仪器

无创血压检测仪(北京软隆科技有限责任公司,型号:BP2010AUL);自动脱水机、自动包埋机、石蜡切片机、全自动 HE 染色封片机、普通光学显微镜(德国 Leica 公司,型号:HistoCore PEARL、HistoCore Arcadia H、RM2235、HistoCore SPECTRA ST、DM500);数字玻片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司,型号:Pannoramic MIDI);全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技公司,型号:Chemray800);蛋白电泳仪、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:Mini-Trans

Blot、ChemiDoc XRS);PCR 梯度基因扩增仪(美国 SCILOGEX 公司,型号:SCI1000-G)。

1.4 动物分组及给药

40 只 SHR 大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为模型组、厄贝沙坦组和天芩止眩方高、中、低剂量组;另取 8 只 WKY 大鼠作为正常组。厄贝沙坦胶囊给药剂量为 13.5 mg/kg;天芩止眩方高、中、低剂量分别为 5.94、2.97、1.49 g/kg;模型组和正常组分别给予等体积蒸馏水。各组均灌胃给药,药液量均为 10 mL/kg,每天 1 次,连续 11 周。

1.5 样本采集及检测

1.5.1 样本收集 最后 1 次给药后,大鼠禁食不禁水 8 h。以 10%水合氯醛腹腔注射进行麻醉,予以腹主动脉采血,4 ℃静置 4 h,3 500 r/min 离心 15 min(离心半径为 15 cm)。取上清液于-80 ℃保存,用于 Ang II、IL-1 β 、TNF- α 以及肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测。快速分离新鲜肾组织,部分置于 4%多聚甲醛固定 24 h,4 ℃冰箱保存;部分放入冻存管,-80 ℃保存。

1.5.2 大鼠收缩压及舒张压检测 于第 1、3、5、7、9、11 周,大鼠给药 1 h 后采用无创血压仪在上午 7:00—12:00 时间段内对大鼠进行测量。将大鼠置于安静环境中固定于容器内,用感应器固定于大鼠尾根部,测量大鼠收缩压及舒张压,每只大鼠重复测量 3 次,取平均值。

1.5.3 肾功能指标检测 将-80 ℃冻存的血清样本解冻后,取 200 μ L,应用全自动生化仪检测各组大鼠血清 Scr、BUN 的含量。

1.5.4 血清 ELISA 检测 取-80 ℃适量血清样本解冻后,按照 ELISA 试剂盒步骤检测各组大鼠血清中 Ang II、IL-1 β 、TNF- α 的含量。设定空白孔、标准孔和待测样品孔,将标准样品、待测样品加入酶标板中。用密封膜密封酶标板,在 37 ℃下孵育 30 min,清洗,拍干。除空白孔外,加入 50 μ L 的酶标记试剂,温育、洗涤、拍干、着色、终止。酶标仪经空白孔调零后,在 450 nm 的波长下测定每个孔的吸光度并分析。

1.5.5 肾组织的病理检测 取新鲜肾组织,生理盐水冲洗后置于 4%多聚甲醛固定 24 h,进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,制备 4 μ m 厚的石蜡肾组织切片,并对切片进行染色。分别按照全自动 HE 染色封片机程序、MASSON 和天狼星红染色试剂盒进行操作,中性树脂封片,光镜下肉眼观察各组大鼠肾组织病理形态变化,并使用数字玻片扫描仪进行拍照与分析。采用 Image J 6.0 计算纤维化率。

1.5.6 免疫组织化学染色检测 肾组织石蜡切片,常规方法进行脱蜡至水,将切片置于 EDTA(pH=9.0)抗原修复液中进行高压修复,加入过氧化物酶阻断剂以阻断内源性过氧化氢酶的活性,室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,孵育一抗(CD68 稀释比例为 1:2 000, TGF- β 1 稀释比例为 1:1 000, Collagen I 稀释比例为 1:1 000, Collagen III 稀释比例为 1:500)。PBS 洗涤 3 次,后续操作按照二步法检测试剂盒 PV-9001 操作, DAB 显色,苏木素染细胞核,中性树脂封片。采用数字玻片扫描仪进行全玻片扫描,随机选择区域,采用 Image J 6.0 软件分析各组目的蛋白阳性表达。

1.5.7 RT-qPCR 检测 称取新鲜肾脏组织 100 mg 于无酶 EP 管中,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,反转录成 cDNA,将所得 cDNA 样品进行 RT-qPCR 扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 min, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	扩增长度/bp
Ang II	正向 GCCAACCTTTGAGCCTGTGC	239
	反向 AGACCAGGGTGCCAAAGAGG	
TGF- β 1	正向 CCCTACATTTGAGCCTGGA	176
	反向 CGCAGCATCATGTTGGACAA	
CD68	正向 GTTCCAGCCATGTGTTCAG	185
	反向 TCCAAAGGTAAGCTGTCCCT	
GAPDH	正向 ACAGCAACAGGCTGTTGGAC	253
	反向 TTTGAGGCTGCAGCGAAGCTT	

1.5.8 Western blot 检测 取新鲜肾脏组织置于 RIPA 裂解液中裂解并提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度并稀释样品。95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 进行 PAGE 凝胶电泳, 上样 20 μ g 后按 80 V 电泳 20 min、120 V 电泳 60 min 的顺序进行电泳, 恒流 400 mA 转膜 40 min。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加 TBST 稀释一抗(TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3 稀释比例均为 1:1 000, CD68 稀释比例为 1:2 000, β -actin 稀释比例为 1:40 000), 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。洗膜 3 次后加入 1:5 000 比例稀释的二抗中, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1 h。采用 ECL 化学发光试剂盒进行曝光显影, 应用化学发光成像系统拍照, Image J 6.0 软件分析灰度值。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 若数据满足正态分布和方差齐

性检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 数据不满足正态性则用 Kruskal-Wallis H 非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 天葵止眩方对 SHR 大鼠尾动脉血压的影响

与正常组比较, 第 1、3、5、7、9、11 周, 模型组收缩压及舒张压均升高($P < 0.001$)。与模型组比较, 第 3、5、7、9、11 周, 厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组收缩压及舒张压均降低($P < 0.01$); 第 5、7、9、11 周, 天葵止眩方低剂量组收缩压及舒张压均降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与厄贝沙坦组及天葵止眩方中剂量组比较, 第 3 周, 天葵止眩方低剂量组收缩压及舒张压均升高($P < 0.05$); 与天葵止眩方高剂量组比较, 第 7、9、11 周, 天葵止眩方低剂量组收缩压及舒张压均升高($P < 0.05$)。详见图 1。

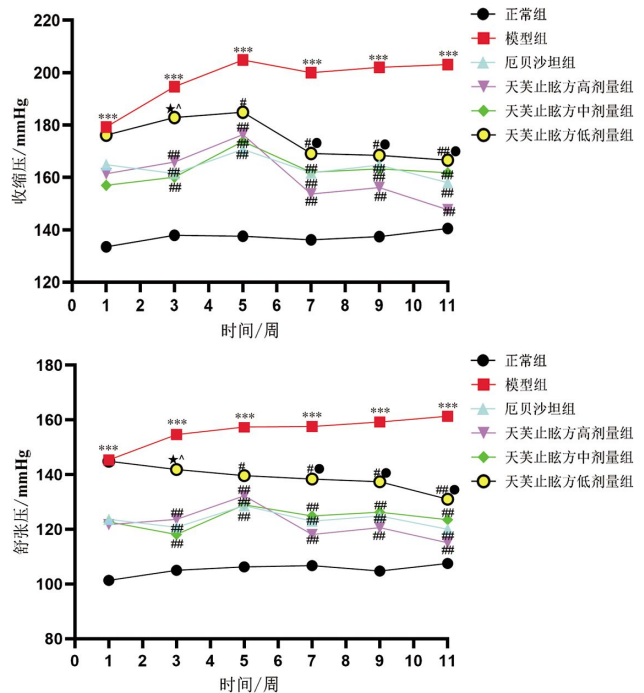


图 1 各组大鼠尾动脉收缩压及舒张压比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig.1 Comparison of systolic and diastolic blood pressure of the tail artery among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

注:与正常组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与厄贝沙坦组比较,* $P < 0.05$;与天葵止眩方高剂量组比较,● $P < 0.05$;与天葵止眩方中剂量组比较,^ $P < 0.05$ 。

2.2 天葵止眩方对SHR大鼠血清肾功能指标的影响

与正常组比较,模型组 BUN、Scr 水平均升高($P < 0.01$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组 BUN、Scr 水平均降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与

厄贝沙坦组及天葵止眩方高剂量组比较,天葵止眩方低剂量组 Scr 水平升高($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠血清 BUN、Scr 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Comparison of serum BUN and Scr levels among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)
正常组	7.13±0.82	52.95±2.62
模型组	12.02±1.42**	62.69±1.68**
厄贝沙坦组	9.69±0.96 [#]	54.58±3.00 [#]
天葵止眩方高剂量组	9.57±0.36 [#]	54.17±1.78 [#]
天葵止眩方中剂量组	9.97±0.66 [#]	55.21±4.26 [#]
天葵止眩方低剂量组	10.81±0.64	60.29±0.85* [●]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与厄贝沙坦组比较,* $P<0.05$;与天葵止眩方高剂量组比较,[●] $P<0.05$ 。

2.3 天葵止眩方对 SHR 大鼠血清促炎因子的影响
与正常组比较,模型组 Ang II、IL-1β、TNF-α 水平均升高($P<0.01, P<0.001$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组 Ang II、IL-1β、TNF-α 水平均下降($P<0.05, P<0.01$),天葵止眩方低剂量组 Ang II、TNF-α 水平均下降($P<0.05$)。详见表 3。

2.4 天葵止眩方对 SHR 大鼠肾组织病理改变的影响
正常组肾组织结构清晰,肾小管排列较有序,间质无明显水肿表现。模型组肾组织结构明显异常,可见肾小球肥大,系膜细胞及基质增生,部分肾小管

扩张,炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞空泡变性。与模型组比较,各治疗组的肾组织病理性损伤均有不同程度的改善,其中厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组对肾组织病理损伤的改善程度最为明显。详见图 2。

2.5 天葵止眩方对 SHR 大鼠肾组织纤维化形成的影响

正常组肾组织中无明显胶原纤维沉积。模型组肾组织间质中胶原纤维沉积明显。厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组肾组织胶原纤维沉积较少。天葵止眩方中、低剂量组肾组织胶原纤维沉积增多。详见图 3。

与正常组比较,模型组肾组织纤维化率增高($P<0.001$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组肾组织纤维化率均减少($P<0.01$)。与厄贝沙坦组及天葵止眩方高剂量组比较,天葵止眩方中、低剂量组肾组织纤维化率均增多($P<0.05, P<0.01$)。与天葵止眩方中剂量组比较,天葵止眩方低剂量组肾组织纤维化率增多($P<0.01$)。详见表 4。

2.6 天葵止眩方对 SHR 大鼠肾组织 Collagen I、Collagen III、TGF-β1 和 CD68 表达的影响

正常组肾组织中几乎无胶原沉积及巨噬细胞促炎表达。模型组肾组织中肾小球及肾间质周围胶原沉积明显,巨噬细胞促炎表达增多。厄贝沙坦组及天

表 3 各组大鼠血清中炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Comparison of inflammatory factor levels in serum among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Ang II/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
正常组	25.21±5.19	4.02±0.55	99.49±7.91
模型组	42.66±5.12***	7.66±1.04**	139.92±12.19***
厄贝沙坦组	28.56±3.76 [#]	4.52±1.68 [#]	101.29±18.99 [#]
天葵止眩方高剂量组	29.32±5.72 [#]	4.48±0.99 [#]	103.00±13.90 [#]
天葵止眩方中剂量组	31.24±2.64 [#]	4.83±1.68 [#]	105.99±9.94 [#]
天葵止眩方低剂量组	33.45±2.82 [#]	6.21±1.91	110.32±8.70 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

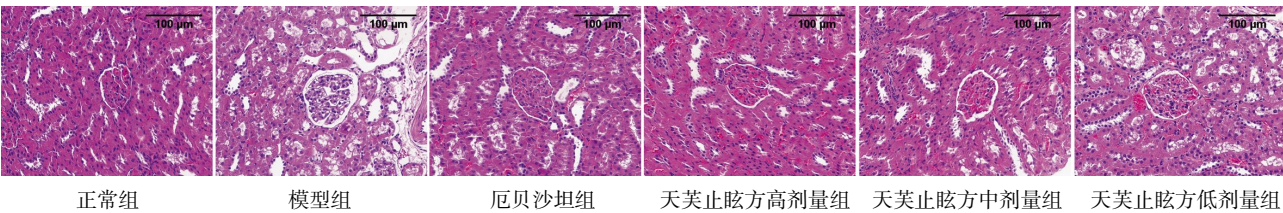


图 2 各组大鼠肾组织病理变化比较(HE,×400)

Fig.2 Comparison of pathological changes in renal tissue among different groups of rats (HE, ×400)

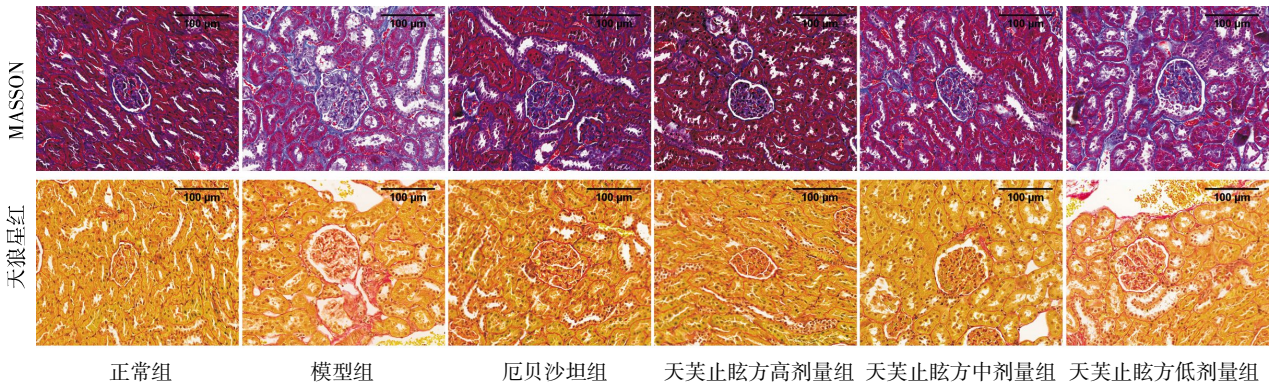


图 3 各组大鼠肾组织胶原纤维沉积情况比较(×400)

Fig.3 Comparison of collagen fiber deposition in renal tissue among different groups of rats (×400)

天美止眩方高、中剂量组肾组织胶原沉积、巨噬细胞促炎表达均减少。天美止眩方低剂量组肾组织胶原沉积及促炎表达增多。详见图 4—5。

表 4 各组大鼠肾组织纤维化率比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of renal tissue fibrosis rates among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	MASSON/%	天狼星红/%
正常组	1.31±0.35	0.97±0.25
模型组	31.97±2.49***	26.61±2.80***
厄贝沙坦组	6.58±1.37 ^{##}	5.70±1.34 ^{##}
天美止眩方高剂量组	5.89±1.21 ^{##}	4.58±1.44 ^{##}
天美止眩方中剂量组	13.12±1.86 ^{##●}	11.38±1.40 ^{##●}
天美止眩方低剂量组	27.48±2.08 ^{***●●~}	21.80±2.73 ^{***●●~}

注:与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与厄贝沙坦组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与天美止眩方高剂量组比较,[●] $P<0.05$,^{●●} $P<0.01$;与天美止眩方中剂量组比较,[~] $P<0.01$ 。

与正常组比较,模型组肾组织中 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1 及 CD68 阳性表达均增多($P<0.001$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及天美止眩方

高、中剂量组 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1 及 CD68 阳性表达均减少($P<0.05, P<0.01$),天美止眩方低剂量组 Collagen III 阳性表达减少($P<0.05$)。与厄贝沙坦组比较,天美止眩方低剂量组 TGF- β 1 阳性表达增多($P<0.05$)。与天美止眩方高剂量组比较,天美止眩方低剂量组 Collagen I、CD68 阳性表达均增多($P<0.05$)。详见表 5。

2.7 天美止眩方对 SHR 大鼠肾组织 Ang II、TGF- β 1、CD68 mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组肾组织 Ang II、TGF- β 1、CD68 mRNA 相对表达量均升高($P<0.01, P<0.001$)。与模型组比较,厄贝沙坦组和天美止眩方高、中剂量组肾组织 Ang II、TGF- β 1、CD68 mRNA 相对表达量均降低($P<0.05, P<0.01$)。详见表 6。

2.8 天美止眩方对 SHR 大鼠肾组织 TGF- β 1、p-Smad2/3 和 Smad2/3 比值及 CD68 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组肾组织 TGF- β 1、p-Smad2/3

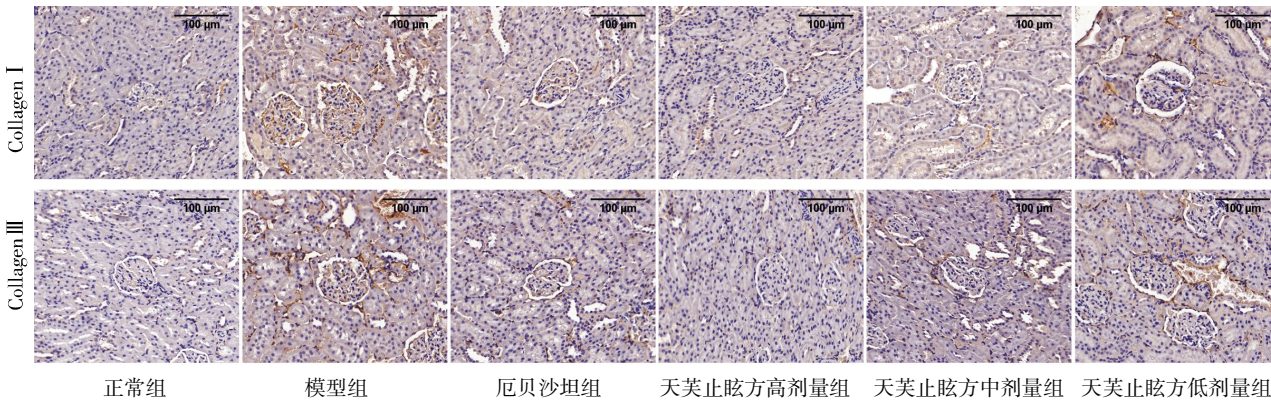


图 4 各组大鼠肾组织 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达比较(免疫组织化学,×400)

Fig.4 Comparison of Collagen I and Collagen III protein expressions in renal tissue among different groups of rats (immunohistochemistry, ×400)

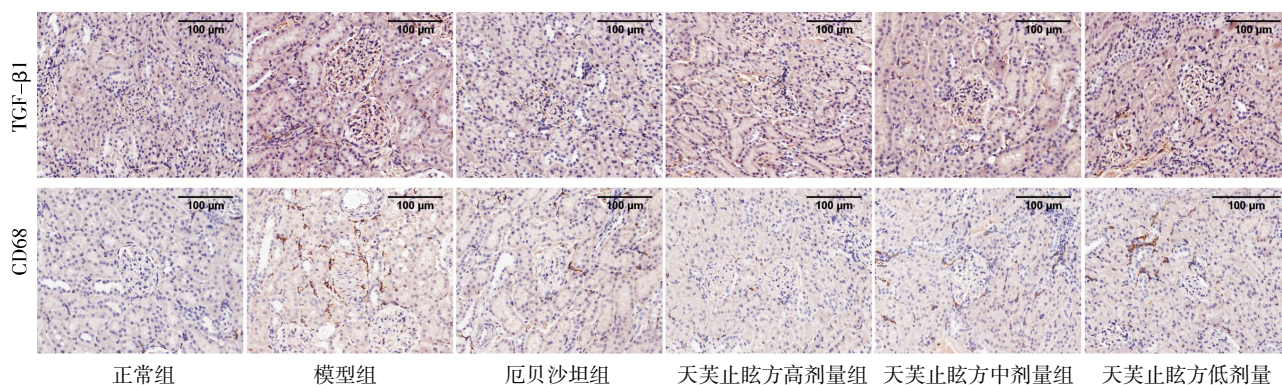


图 5 各组大鼠肾组织 TGF-β1 和 CD68 蛋白表达比较(免疫组织化学,×400)

Fig.5 Comparison of TGF-β1 and CD68 protein expressions in renal tissue among different groups of rats (immunohistochemistry, ×400)

表 5 各组大鼠肾组织 Collagen I、CollagenⅢ、TGF-β1、CD68 蛋白阳性表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Comparison of positive expressions of Collagen I, CollagenⅢ, TGF-β1, and CD68 proteins in renal tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Collagen I	CollagenⅢ	TGF-β1	CD68
正常组	0.94±0.05	0.91±0.11	1.52±0.14	0.54±0.06
模型组	2.01±0.10***	2.34±0.22***	2.68±0.08***	1.08±0.06***
厄贝沙坦组	1.50±0.01 [#]	1.59±0.10 ^{##}	2.23±0.06 ^{##}	0.89±0.07 [#]
天葵止眩方高剂量组	1.39±0.22 ^{##}	1.57±0.12 ^{##}	2.26±0.03 ^{##}	0.78±0.02 ^{##}
天葵止眩方中剂量组	1.53±0.18 [#]	1.74±0.08 ^{##}	2.40±0.08 [#]	0.90±0.01 [#]
天葵止眩方低剂量组	1.76±0.10 [●]	1.89±0.11 [#]	2.47±0.05 [*]	0.94±0.07 [●]

注:与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与厄贝沙坦组比较,^{*} $P<0.05$;与天葵止眩方高剂量组比较,[●] $P<0.05$ 。

表 6 各组大鼠肾组织 AngⅡ、TGF-β1、CD68 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Comparison of AngⅡ, TGF-β1, and CD68 mRNA expressions in renal tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	AngⅡ	TGF-β1	CD68
正常组	1.04±0.04	0.98±0.11	1.03±0.06
模型组	2.43±0.42**	2.26±0.31**	4.27±0.55***
厄贝沙坦组	1.36±0.20 [#]	1.33±0.37 [#]	2.48±0.64 [#]
天葵止眩方高剂量组	1.36±0.17 [#]	1.25±0.28 [#]	1.88±0.06 ^{##}
天葵止眩方中剂量组	1.53±0.22 [#]	1.34±0.08 [#]	2.75±0.60 [#]
天葵止眩方低剂量组	1.99±0.22	1.52±0.46	3.19±0.75

注:与正常组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.011$ 。

与 Smad2/3 比值、CD68 蛋白表达量均上调($P<0.01$)。与模型组比较,厄贝沙坦组及天葵止眩方高、中剂量组肾组织 TGF-β1、p-Smad2/3 与 Smad2/3 比值、CD68 的蛋白表达量均下调($P<0.05$, $P<0.01$)。与厄贝沙坦组及天葵止眩方高剂量组比较,天葵止眩方低剂量组

肾组织 p-Smad2/3 和 Smad2/3 比值上调($P<0.05$)。详见图 6、表 7。

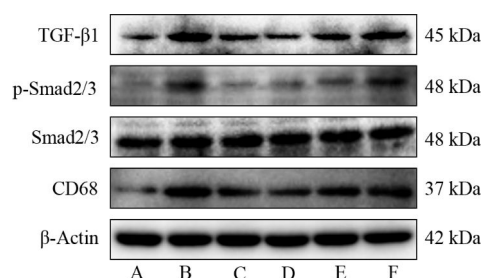
图 6 各组大鼠肾组织 TGF-β1、p-Smad2/3、Smad2/3、CD68 蛋白表达比较($n=3$)

Fig.6 Comparison of TGF-β1, p-Smad2/3, Smad2/3, and CD68 protein expressions in renal tissue among different groups of rats ($n=3$)

注:A.正常组;B.模型组;C.厄贝沙坦组;D.天葵止眩方高剂量组;E.天葵止眩方中剂量组;F.天葵止眩方低剂量组。

3 讨论

中医学从辨证的角度将高血压归属于“眩晕”“头痛”“肝风”等范畴。中医学认为,高血压发病主要

表 7 各组大鼠肾组织中 TGF-β1、p-Smad2/3 和 Smad2/3、CD68 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Comparison of TGF-β1, p-Smad2/3, Smad2/3, and CD68 protein expressions in renal tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	TGF-β1/β-Actin	p-Smad2/3 和 Smad2/3	CD68/β-Actin
正常组	0.67±0.10	0.43±0.15	0.44±0.14
模型组	1.34±0.10**	1.12±0.03**	0.98±0.04**
厄贝沙坦组	0.82±0.11 [#]	0.51±0.26 [#]	0.59±0.06 [#]
天芩止眩方高剂量组	0.82±0.14 [#]	0.50±0.05 [#]	0.51±0.19 ^{##}
天芩止眩方中剂量组	0.90±0.19 [#]	0.61±0.02 [#]	0.59±0.10 [#]
天芩止眩方低剂量组	1.17±0.25	0.93±0.13*●	0.75±0.09

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与厄贝沙坦组比较,* $P<0.05$;与天芩止眩方高剂量组比较,● $P<0.05$ 。

是由于风、痰、瘀、虚等病邪引起风眩内动、痰瘀交阻、气血阻滞、清窍失养,病属本虚标实证^[15]。高血压主要病位在肝,病情发于肾,初为肝阳上亢,而乙癸同源,亢阳销烁阴液,久致肝肾阴虚,则脉络失养,行血不畅,瘀阻肾络,肾失封藏,精微外泄,而致肾损害^[16]。肾为先天之本,肾元不足,致脾土亏损,因而水液代谢异常,痰湿内生。故而血行艰涩成瘀,痰瘀胶结郁久化火,血脉不通,脏腑失养而加重五脏虚损,进一步加重眩晕。因此,肝风、瘀阻、痰浊是眩晕发病的重要病理基础^[17]。根据以上病机化裁而来的天芩止眩方由天麻、钩藤、法半夏等多味中药组成,方中天麻平肝息风、祛风通络,钩藤清热平肝、息风止痉,两者共为君药;法半夏燥湿化痰,白术健脾燥湿,两者为臣药;佐以茯苓利水渗湿,陈皮理气化痰,甘草调和诸药。全方共奏平肝息风、利湿化痰之功效。本研究利用 SHR 大鼠模型,以不同剂量的天芩止眩方进行治疗,结果显示,天芩止眩方高、中剂量组第 3、5、7、9、11 周大鼠舒张压和收缩压明显降低,而天芩止眩方低剂量组第 5、7、9、11 周血压明显降低,说明该方具有良好的抗高血压效果。

天麻、钩藤是天芩止眩方的重要组成,现代药理研究表明,天麻和钩藤的主要有效成分为天麻素和钩藤碱,二者均可通过调控 TGF-β1 及其下游信号通路抑制氧化应激、降低炎症反应,从而改善因高血压引起的肾纤维化^[9,18]。高血压肾损伤患者血清 BUN、Scr 水平上升,二者是判断肾小球滤过功能的重要指标,因此,多用于诊断及评价肾脏疾病^[19]。高血压大鼠中 Ang II 及促炎介质的增多可刺激肾小球系膜细胞的增殖并诱导 ECM 沉积,从而导致过度的肾纤维化^[20]。本研究结果发现,天芩止眩方能有效降低 SHR 大鼠血清中 BUN、Scr 的水平,改善肾功能指标,抑制血清中 Ang II、IL-1β、TNF-α 促炎因子的释放。HE 染色结果显示,天芩止眩方治疗后肾组织的

损伤减轻,炎症细胞浸润减少。以上结果表明,天芩止眩方能减轻炎症,对肾脏功能具有保护作用。此外,Masson、天狼星红染色以及免疫组织化学染色结果均显示,SHR 大鼠在 19 周龄时,出现明显的肾纤维化,而天芩止眩方治疗能明显降低纤维化程度,降低 Collagen I 和 Collagen III 表达。因此,天芩止眩方对高血压引起的肾纤维化具有明显的抑制作用。

TGF-β1/Smad 信号通路是肾纤维化的关键通路,TGF-β1 通过经典的 Smad2/3 信号,促进下游基因 Collagen I 和 Collagen III 的转录^[21-22]。因此,本研究通过免疫组织化学染色,Western blot 以及 RT-qPCR 等方法,检测 SHR 大鼠肾组织中 TGF-β1、p-Smad2/3 的水平,结果显示,模型组大鼠肾组织中 TGF-β1 和 Smad2/3 蛋白磷酸化水平明显升高,而天芩止眩方治疗后能显著降低其表达。近期研究表明,肾巨噬细胞对肾纤维化的调节至关重要,在肾脏损伤时,当循环血液中的单核细胞被招募到损伤部位时,在不同因子作用下分化为促炎(M1 型)或抑炎(M2 型)巨噬细胞,M1 型巨噬细胞表现出典型的促炎表型,表达 CD68、CD86 等标志蛋白,主要通过分泌 IL-1β、TNF-α 等炎症因子和活性氧,促进炎症反应,加重组织损伤和纤维化^[23-24]。巨噬细胞对高血压肾纤维化的发生至关重要,巨噬细胞的炎症作用被认为有助于肾纤维化^[25]。高血压患者巨噬细胞表型和数量发生显著变化,而抑制巨噬细胞活化能降低促炎标志物在肾中的表达并减轻肾纤维化,有效降低高盐及 Ang II 诱导的高血压^[26-27],表明巨噬细胞可增强肾脏炎症,导致高血压肾纤维化的发生。本研究通过免疫组织化学染色、Western blot 以及 RT-qPCR 等检测了肾组织中 CD68 的表达。结果显示,模型组大鼠肾组织中,CD68 蛋白和 mRNA 表达显著增加,而天芩止眩方高、中剂量组能显著降低 CD68 的表

达。因此,本研究的结果表明,天芩止眩方具有抑制促炎巨噬细胞、降低组织炎症、减轻肾纤维化的作用。

综上所述,天芩止眩方能有效降低 SHR 大鼠血压、改善肾功能,可能与其抑制组织炎症和 TGF- β 1/Smad 信号通路,减轻肾纤维化有关。

参考文献

- [1] SAXENA T, ALI A O, SAXENA M. Pathophysiology of essential hypertension: An update[J]. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2018, 16(12): 879-887.
- [2] CHEUNG A K, RAHMAN M, REBOUSSIN D M, et al. Effects of intensive BP control in CKD[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2017, 28(9): 2812-2823.
- [3] NISHIMOTO M, GRIFFIN K A, WYNNE B M, et al. Salt-sensitive hypertension and the kidney[J]. Hypertension, 2024, 81(6): 1206-1217.
- [4] DE BHAILIS Á M, KALRA P A. Hypertension and the kidneys[J]. British Journal of Hospital Medicine, 2022, 83(5): 1-11.
- [5] SUN H J. Current opinion for hypertension in renal fibrosis[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1165: 37-47.
- [6] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : The master regulator of fibrosis[J]. Nature Reviews Nephrology, 2016, 12(6): 325-338.
- [7] JI J, HE L Q. Effect of kangxianling decoction on expression of TGF- β 1/smads and extracellular matrix deposition[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019, 2019: 5813549.
- [8] GU Y Y, LIU X S, HUANG X R, et al. TGF- β in renal fibrosis: Triumphs and challenges[J]. Future Medicinal Chemistry, 2020, 12(9): 853-866.
- [9] WEN Y, ZHANG X L, WEI L H, et al. Gastrodin attenuates renal injury and collagen deposition via suppression of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway based on network pharmacology analysis[J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1082281.
- [10] XU H, WANG C, SONG T T, et al. Effects of Ziyin Qianyang formula on renal fibrosis through the TGF- β 1/smads signaling pathway in spontaneously hypertensive rats[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 6088673.
- [11] 吴 赛, 姜月华, 杨传华, 等. 半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压大鼠心肌 MAPK 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 159-165.
- [12] 王 震, 姜月华, 吴 赛, 等. 半夏白术天麻汤改善肥胖性高血压大鼠肾脏损害的机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(9): 2130-2133.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 123.
- [14] 邹蔓姝, 王宇红, 曾贵荣, 等. 复方钩藤止眩方对不同模型高血压大鼠的降压效应及犬血流动力学的影响[J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(1): 21-28.
- [15] 张 硕, 陈霖霖, 唐于平. 中医药辨治高血压的认识与发展[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2020, 22(12): 4139-4146.
- [16] 王 鹏, 裴朝华, 方 芳, 等. 益气化痰、平肝滋肾方治疗高血压肾损害的临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(15): 2822-2826.
- [17] 郑清华, 孟 伟. 浅谈郭维琴教授从虚、火、痰、瘀理论辨治老年高血压经验[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(22): 4242-4245.
- [18] 黄 华, 李宇声, 金 鑫, 等. 钩藤碱对自发性高血压大鼠心室重构过程中 TGF- β 1/Smad 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(8): 1365-1370.
- [19] 李雅云, 李 艳, 朱关保, 等. 基于代谢组学技术探讨除湿化浊降酸方对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(6): 1006-1013.
- [20] FRANCO M, PÉREZ-MÉNDEZ O, KULTHINEE S, et al. Integration of purinergic and angiotensin II receptor function in renal vascular responses and renal injury in angiotensin II-dependent hypertension[J]. Purinergic Signalling, 2019, 15(2): 277-285.
- [21] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2018, 292: 76-83.
- [22] 蔡亚宏, 刘林券, 冯 进, 等. 六味地黄汤调控 TGF- β 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.
- [23] LIAO Y, TAN R Z, LI J C, et al. Isoliquiritigenin attenuates UUO-induced renal inflammation and fibrosis by inhibiting mincle/syk/NF- κ B signaling pathway[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2020, 14: 1455-1468.
- [24] YE S J, HUANG H, XIAO Y, et al. Macrophage Dectin-1 mediates Ang II renal injury through neutrophil migration and TGF- β 1 secretion[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2023, 80(7): 184.
- [25] PETER J K, UMENE R, WU C H, et al. Renal macrophages induce hypertension and kidney fibrosis in Angiotensin II salt mice model[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 715: 149997.
- [26] HUANG L, WANG A M, HAO Y, et al. Macrophage depletion lowered blood pressure and attenuated hypertensive renal injury and fibrosis[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 473.
- [27] DRUMMOND G R, VINH A, GUZIK T J, et al. Immune mechanisms of hypertension[J]. Nature Reviews Immunology, 2019, 19(8): 517-532.

(本文编辑 周 旦)