

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001812

益气、化痰、化痰中药制剂及其合剂对肾间质纤维化大鼠 TGF- β 1/Smad 通路及 TRB3 的影响

张永越¹, 曹文富², 田 晟², 吴 庆²

(1. 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察益气、化痰、化痰中药制剂及其合剂——益气化痰化痰制剂对单侧输尿管结扎(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型大鼠肾间质纤维化的影响及其可能机制。**方法:**42 只雌性 SD 大鼠, 随机分为假手术组、模型组、替米沙坦组、益气组、化痰组、化痰组及益气化痰化痰组, 每组 6 只。除假手术组外, 其余各组采用 UUO 法建立肾间质纤维化模型。UUO 术后 3 周, 模型组及假手术组以等量生理盐水灌胃, 其余各组以相应制剂灌胃治疗, 每日 1 次, 连续用药 12 周后处死大鼠。检测大鼠血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(serum creatinine, Scr)水平。取大鼠术侧肾组织, HE 染色观察组织形态学改变, Masson 染色观察胶原纤维沉积情况, Western blot 检测转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达水平; qRT-PCR 检测 TGF- β 1、Smad3、Smad7、TRB3、 α -SMA、E-cadherin mRNA 表达水平。**结果:**与假手术组比较, 模型组肾间质纤维化明显, BUN、Scr 水平明显升高($P < 0.01$), 而各药物干预组肾间质纤维化程度及 BUN、Scr 水平均较模型组明显改善, 其中益气化痰化痰组、替米沙坦组及益气组改善较明显($P < 0.05$)。与模型组相比, 益气化痰化痰组、替米沙坦组及益气组 TGF- β 1、Smad3、TRB3、 α -SMA mRNA 表达明显降低($P < 0.05$), E-cadherin mRNA 表达明显升高($P < 0.05$)。各组间 Smad7 mRNA 表达无显著差异。TGF- β 1、 α -SMA、E-cadherin 的蛋白表达与其 mRNA 表达趋势一致。**结论:**益气、化痰、化痰及益气化痰化痰中药制剂和替米沙坦均能改善 UUO 大鼠肾间质纤维化, 且以益气化痰化痰制剂、替米沙坦及益气制剂的改善作用较为明显, 其机制可能是通过调控 TRB3、TGF- β 1/Smad 信号通路, 进而抑制肾小管上皮细胞向间充质细胞转化。

【关键词】肾间质纤维化; 单侧输尿管结扎; 益气化痰化痰; 转化生长因子- β 1; Smad3; TRB3**【中图分类号】**R285.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-21

Effect of Yiqi, Huayu, Huatan preparation and their mixed preparation on TGF β 1/Smad pathway and TRB3 in rats with renal interstitial fibrosis

Zhang Yongyue¹, Cao Wenfu², Tian Sheng², Wu Qing²

(1. Department of Integration of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine,

the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effect of Yiqi Huayu Huatan preparation and their mixed preparation on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction(UUO) and investigate the possible mechanism. **Methods:** Totally 42 female sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group, model group, telmisartan group, Yiqi group, Huayu group, Huatan group and Yiqi Huayu Huatan group, with 6 rats in each group. Except for the sham operation group, the model was established by ligating left ureter of the rats. After 3 weeks, sham operation group and model group were treated with equal amount of normal saline, the other groups were treated with the corresponding decoction, once a day. After 12 weeks, the rats were sacrificed. The serum samples were

collected for determination of concentrations of BUN and Scr. The morphological changes of renal tissue were observed by HE staining. The collagen fiber was observed by Masson staining. The protein expression levels of TGF- β 1, α -SMA and E-cadherin were detected by Western blot. The mRNA expression levels of TGF- β 1, Smad3, Smad7, TRB3, α -SMA and E-

作者介绍:张永越, Email: 1506197716@qq.com,

研究方向: 从事中西医结合器官纤维化基础研究。

通信作者:曹文富, Email: 13883658367@163.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 81573860)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1016.020.html>
(2018-07-05)

cadherin were detected by qRT-PCR. **Results**: Compared with those in sham operation group, the renal interstitial fibrosis, the concentrations of BUN and Scr were significantly increased in the model group ($P < 0.01$), while the collagen fiber deposition and the levels of BUN and Scr were significantly reduced by Yiqi Huayu Huatan preparation, telmisartan and Yiqi preparation ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the expressions of TGF- β 1, Smad3, TRB3, and α -SMA in Yiqi Huayu Huatan, telmisartan and Yiqi group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of Smad7 among the groups. **Conclusion**: Yiqi, Huayu, Huatan, Yiqi Huayu Huatan preparation and telmisartan could alleviate renal interstitial fibrosis, but Yiqi Huayu Huatan preparation, telmisartan and Yiqi preparation showed better curative effect. This may be related to the inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) mediated by TRB3 and TGF- β 1/Smad signal pathway.

[Key words] renal interstitial fibrosis; unilateral ureteral obstruction; Yiqi Huayu Huatan; transforming growth factor- β 1; Smad3; TRB3

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同途径。研究表明, RIF 以成纤维细胞增殖、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过量沉积及肾小管萎缩等为病理特点^[1]。中医学者认为, 这一病理改变属“癥积”范畴^[2], 其病机主要为“气虚、血瘀、痰凝及痰瘀互结”, 属本虚标实之证。国内外研究均表明, 上皮-间充质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是 RIF 发生发展的重要机制^[3], 主要由 TGF- β 1/Smad 通路介导^[4], Tribbles 蛋白家族成员 TRB3 是 TGF β 1/Smad 信号通路的一种正性调控因子^[5], 可通过与 Smad3 相互作用, 对 EMT 过程起促进作用。当前对 RIF 已有较多研究, 但其发病机制尚未完全阐明^[6-9]。针对其病因病机, 中医界多采用益气活血、益气祛瘀、益气化痰泄浊等法进行治疗, 均取得一定疗效。但对于益气、化痰、化痰中药单独使用是否存在疗效上的差别, 在组方中发挥主要作用的是哪类中药则鲜见相关文献报道。故在前期研究^[10-12]基础上, 本研究以益气、化痰、化痰立法论治, 以参与纤维化进程的 TGF- β 1、Smad3、Smad7、TRB3 及 EMT 生物标志物 E-Cadherin、 α -SMA 等作为主要观察指标, 探讨益气、化痰、化痰及益气化痰化痰中药制剂对 UUO 模型大鼠 RIF 的影响及可能机制, 并对各制剂疗效进行比较, 以期为实验研究及临床用药提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 42 只, 体质量 180~

220 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供[动物许可证号: SYXK(渝)2012-0001], 并饲养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 级动物房。

1.1.2 药品及试剂 中药饮片黄芪、白术、川芎、姜黄、瓜蒌、海藻(购于重庆医科大学附属第一医院中药房, 由重庆医科大学中医药研究室曹文富教授鉴定合格); 替米沙坦(国药准字 H20080222, 批号: 6160616, 购于重庆医科大学附属第一医院西药房); TGF- β 1 兔多抗(购于美国 Abcam 公司); E-Cadherin 兔多抗、 α -SMA 兔多抗(购于武汉塞维生物公司); HRP 标记羊抗兔 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG、 β -actin 鼠单抗(购于美国 EARTH 公司); RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、蛋白 Marker(购于碧云天生物技术公司); PCR 引物(成都宝生生物公司合成); Trizol、RR037A 逆转录试剂盒、SYBR Premix(购于日本 TaKaRa 公司); 肌酐测定试剂盒(肌氨酸氧化酶法)、尿素氮测定试剂盒(脲酶法)(购于南京建成生物工程研究所)。

1.1.3 仪器设备 T100™ PCR 仪(美国 BIORAD 公司)、ThermoND2000 超微量核酸蛋白测定仪(上海 GENE 公司)、AL204 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)、低温高速离心机(德国 SIGMA 公司)、CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统(美国 BIORAD 公司)、BX53 荧光正置显微镜及 CellSens Standard 图像采集软件(日本 OLYMPUS 公司)、化学发光成像仪(美国 Odyssey-FC)、-80 °C 超低温冰箱(Haier 公司)、旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 UUO 模型建立 大鼠适应性喂养 1 周, 禁食不禁水 12 h 后, 2%戊巴比妥钠以 0.25 mL/100 g 剂量腹腔注射。常规备皮、消毒、铺巾, 于左肋缘下脊柱旁开 1.5 cm 处作 2 cm 左右切口, 将左肾轻轻牵拉出切口, 在肾蒂处脂肪内沿左肾下极寻找输尿管, 齐左肾下极用 4-0 丝线结扎输尿管, 距结扎点 0.7 cm 处再次结扎, 于两结扎点间剪断输尿管, 将左肾还纳腹腔, 依次缝合肌肉筋膜、皮肤, 切口消毒。假手术组除不结扎剪断输尿管, 其余操作相同。

1.2.2 药物制备 各中药饮片均按《中国药典》(2015 版)规定的临床常用量,即益气法制剂:黄芪 30 g、白术 10 g;化痰法制剂:川芎 10 g、姜黄 10 g;化痰法制剂:瓜蒌 10 g、海藻 10 g;益气化痰化痰法制剂:黄芪 30 g、白术 10 g、川芎 10 g、姜黄 10 g、瓜蒌 10 g、海藻 10 g。将相应中药饮片混合水提,用旋转蒸发仪浓缩成含生药 2 g/mL 的制剂,4 ℃冰箱中保存备用。替米沙坦制剂:替米沙坦用生理盐水配成 2 mg/mL 的制剂,现配现用。

1.2.3 分组及给药 UUO 术后 3 周将大鼠随机分为假手术组、模型组、替米沙坦组、益气组、化痰组、化痰组及益气化痰化痰组,每组 6 只。根据《药理实验方法学》体表面积折算法计算大鼠用药剂量,成人体质量以 70 kg 算,大鼠等效剂量为成人 6.3 倍。由此可得大鼠各制剂剂量:益气法制剂 3.6 g/kg;化痰法制 1.8 g/kg;化痰法制剂 1.8 g/kg;益气化痰化痰法制剂:7.2 g/kg;替米沙坦剂量为 3.6 mg/kg,各组制剂间的体积差用生理盐水补齐。各干预组大鼠予相应治法制剂灌胃,模型组、假手术组予等体积生理盐水灌胃。各组大鼠实验期间每日灌胃 1 次,分笼饲养,自由饮水、进食相同的大鼠标准饲料。

1.2.4 标本采集 灌胃 12 周并于末次灌胃后,禁食不禁水 12 h,2%戊巴比妥钠以 0.25 mL/100 g 剂量腹腔注射麻醉大鼠,心脏取血,分离血清于-80 ℃保存,用于检测尿素氮、肌酐。取术侧肾脏,部分肾组织放入液氮速冻后转入-80 ℃保存,用于 Western blot 及 qRT-PCR 检测,部分肾组织用 4%多聚甲醛固定。

1.2.5 肾功能检测 血清尿素氮、肌酐检测均严格按试剂盒说明书操作。

1.2.6 肾组织形态学观察 肾组织固定后,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、制成 3 μm 厚切片;按试剂说明进行 HE 染色、Masson 染色后,脱水,透明,中性树胶封片。

1.2.7 qRT-PCR 检测相关基因表达 Trizol 法提取总 mRNA,在 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s 条件下逆转录合成 cDNA。按如下条件进行扩增:预变性:95 ℃ 30 s;PCR 反应:95 ℃变性 5 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 40 次。采用 qRT-PCR 相对定量方法($\Delta\Delta C_t$ 值比较法)进行分析: $\Delta\Delta C_t = (\text{干预组 } C_t - \text{内参 } C_t) - (\text{假手术组 } C_t - \text{内参 } C_t)$,平均相对含量 = $2^{-\text{average } \Delta\Delta C_t} \times 100\%$ 。qRT-PCR 引物信息见表 1。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达 RIPA 裂解液提取肾组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,用 5×上样缓冲液配平各蛋白样品,上样进行 SDS-PAGE。根据蛋白 Marker 位置切下目的蛋白所在的 PAGE 胶;将蛋白转至 PVDF 膜后,用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h。加一抗,摇床 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 5 min × 3 次。室温下二抗孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min × 3 次。化学发光成像仪中显影。目的蛋白与内参 β -actin 灰度值之

比为该蛋白的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因			产物长度 (bp)
TGF- β 1	上游	AGGCGGTGCTCGCTTTGTA	137
	下游	GATTGCCGTTGTTGCCGCTCC	
Smad3	上游	GCACAGCCACCATGAGTTACG	131
	下游	GCACCAACACTGGAGGTAGCA	
Smad7	上游	TACCTTCCTCCGATGAAACCG	129
	下游	GAGTCTTCTCCTCCCACTATGCC	
TRB3	上游	GCAGGAAGAAACCGTTGGAGT	119
	下游	CAAGTCTGAGCGGGAGGCTAG	
α -SMA	上游	CAACTGGTATTGTGCTGGACTCTG	174
	下游	GCTCAGCAGTAGTCACGAAGGAAT	
E-cadherin	上游	TCCTCTGCTCCTACTGTTTCT	113
	下游	TCCACCTCCCTCTTCATCATAG	
β -actin	上游	ACCGTGAAAAGATGACCCAGAT	164
	下游	GTAACCCTCATAGATGGGCACA	

1.3 数据统计

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 大鼠一般状况

假手术组大鼠精神状态良好,活动敏捷,进食饮水正常,皮毛光滑;模型组大鼠与假手术组大鼠相比,精神状态略差,活动减少,皮毛杂乱、色泽黯淡,进食饮水基本正常;各药物干预组大鼠较模型组一般情况均有改善,其中益气化痰化痰组大鼠改善最明显,其次为替米沙坦组、益气组。

2.2 肾组织形态学观察

HE、Masson 染色显示正常组大鼠肾小管和肾小球结构正常,未见明显组织学改变,仅肾小球基膜、系膜区及小管周围间质区见少量胶原纤维呈线状分布;模型组大鼠肾小球数量减少,肾小管严重萎缩,炎性细胞弥漫浸润,肾间质区及系膜区增宽伴大量胶原纤维沉积;各药物干预组较模型组间质纤维化程度有所减轻,其中益气化痰化痰组、替米沙坦组及益气组改善较明显。结果如图 1、图 2 所示。

2.3 对血清尿素氮和肌酐的影响

模型组 BUN、Scr 水平较假手术组明显升高($P<0.01$);与模型组相比,益气化痰化痰组、替米沙坦组、益气组及化痰组 BUN、Scr 水平明显下降($P<0.05$),其中益气化痰化痰组、替米沙坦组下降较明显($P<0.01$)。结果见表 2。

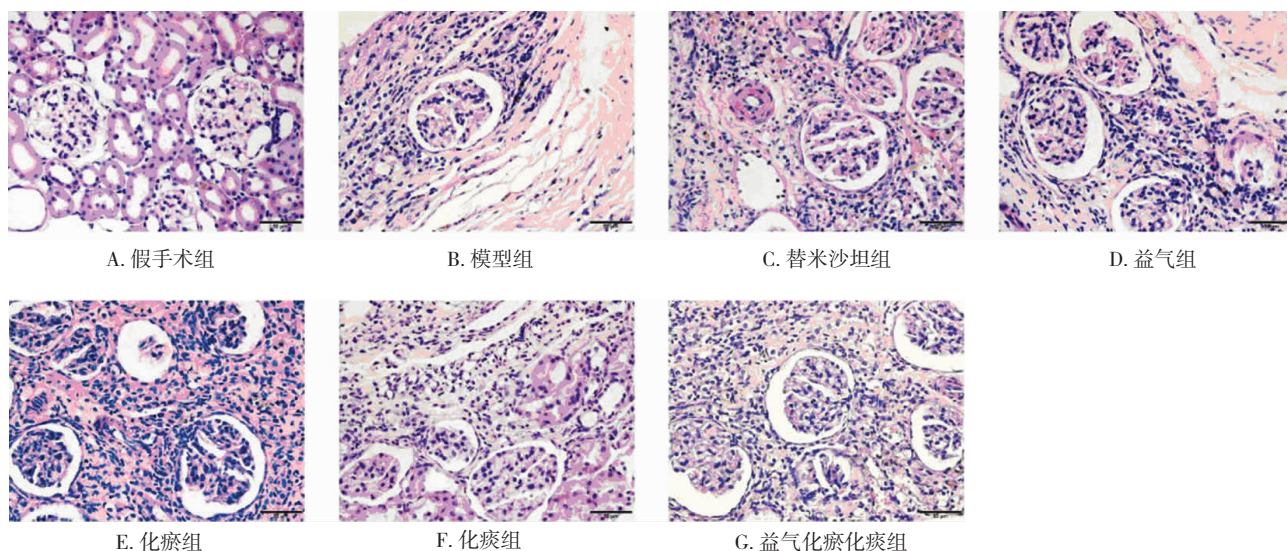


图 1 各组大鼠肾组织肾组织形态变化 (HE, 400 ×)

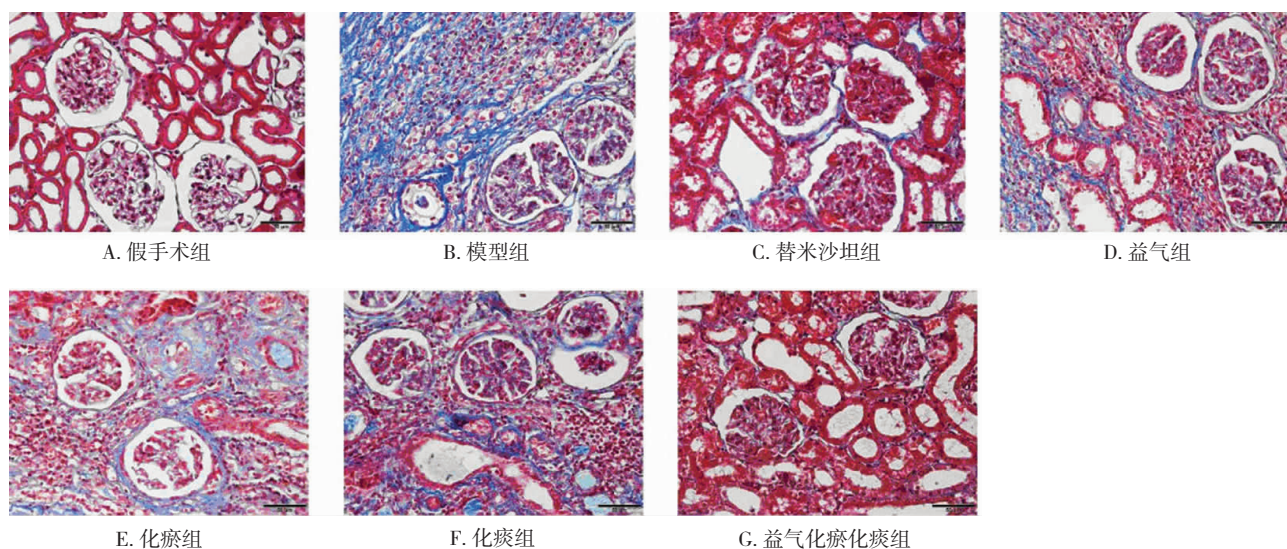


图 2 各组大鼠肾组织胶原沉积情况 (Masson, 400 ×)

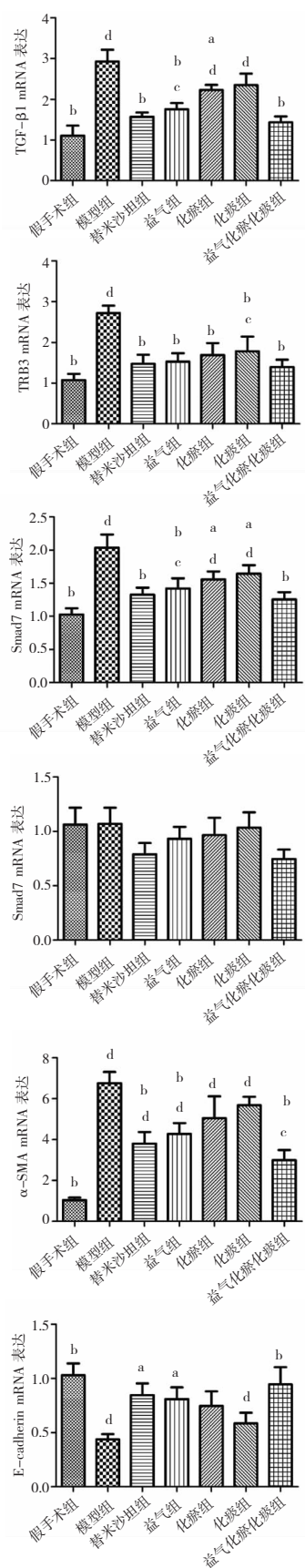
表 2 各组大鼠血清 BUN、Scr 比较

组别	BUN (mmol/L)	Scr (μmol/L)
假手术组	7.75 ± 0.93 ^b	52.30 ± 7.62 ^b
模型组	11.01 ± 1.40 ^d	95.79 ± 10.72 ^d
替米沙坦组	9.27 ± 0.87 ^{bc}	68.45 ± 9.72 ^{bd}
益气组	9.50 ± 1.14 ^{ad}	73.63 ± 7.09 ^{bd}
化痰组	9.78 ± 0.71 ^{ad}	77.03 ± 3.80 ^{bd}
化痰组	10.54 ± 0.93 ^d	83.64 ± 9.54 ^{ad}
益气化痰化痰组	8.30 ± 0.57 ^b	59.20 ± 9.45 ^b
F 值	8.485	17.606
P 值	0.000	0.000

注: a, 与模型组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较, $P < 0.01$; c, 与假手术组比较, $P < 0.05$; d, 与假手术组比较, $P < 0.01$

2.4 对 TGF- β 1/Smad 通路、TRB3、 α -SMA 及 E-cadherin mRNA 表达的影响

qRT-PCR 显示, 模型组 TGF- β 1、TRB3 mRNA 表达较假手术组明显上调 ($P < 0.01$), 益气化痰化痰组、益气组、替米沙坦组较模型组明显下调 ($P < 0.01$)。模型组 Smad3 mRNA 表达较假手术组明显上调 ($P < 0.01$), 各药物干预组 Smad3 mRNA 表达较模型组明显下调 ($P < 0.05$), 其中益气化痰化痰组、替米沙坦组、益气组下调较明显 ($P < 0.01$)。各组间 Smad7 mRNA 表达无显著差异, 但其变化趋势与 Smad3 mRNA 基本一致。模型组 α -SMA mRNA 表达较假手术组明显上调 ($P < 0.01$), 益气化痰化痰组、替米沙坦、益气组表达较模型组明显下调 ($P < 0.01$), 其余干预组与模型组相比无统计学差异。模型组 E-cadherin mRNA 表达较假手术组明显下调 ($P < 0.01$), 益气化痰化痰、替米沙坦组、益气组较模型组明显上调 ($P < 0.05$), 其余各干预组与模型组相比无统计学差异。结果如图 3 所示。

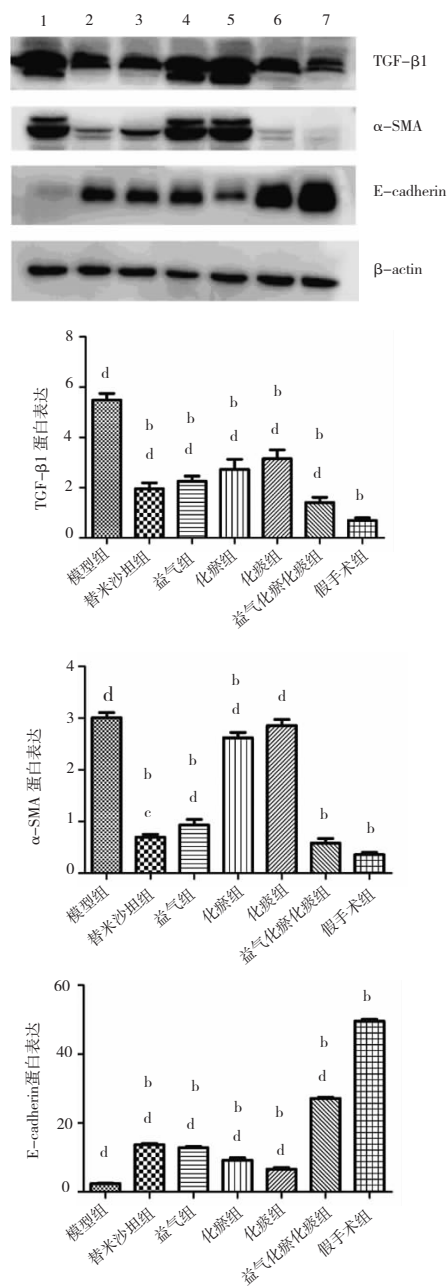


a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与假手术组比较, $P < 0.05$; d: 与假手术组比较, $P < 0.01$

图3 各组大鼠肾组织纤维化相关基因的表达

2.5 对肾间质纤维化大鼠肾组织 TGF-β1、α-SMA 及 E-cadherin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,模型组 TGF-β1、α-SMA 表达假手术组明显上调 ($P < 0.01$), E-cadherin 表达较假手术组明显下调 ($P < 0.01$); 药物干预后,益气化痰化痰组、替米沙坦组、益气组、化痰组 TGF-β1、α-SMA 表达较模型组明显下调 ($P < 0.05$), E-cadherin 表达较模型组明显上调 ($P < 0.01$)。结果如图4所示。



1: 模型组; 2: 替米沙坦组; 3: 益气组; 4: 化痰组; 5: 化痰组; 6: 益气化痰化痰组; 7: 假手术组

a: 与模型组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与假手术组比较, $P < 0.05$; d: 与假手术组比较, $P < 0.01$

图4 各组大鼠肾组织 TGF-β1、α-SMA、E-cadherin 蛋白的表达

3 讨论

RIF 程度与肾功能损害程度密切相关^[13],多数病人在诊断为慢性肾病时已出现不同程度的纤维化病变。对患者而言,肾脏病进展至终末期将终生透析或进行肾移植,因此延缓肾纤维化、改善肾功能对提高患者生存质量及减轻医疗负担具有重要意义。

本研究采用 UUO 法建立 RIF 大鼠模型,该模型是观察 RIF 的经典模型^[14-15],具有成模率高、重复性好的优点。值得一提的是,在多数研究中,RIF 的干预策略为预防性给药,即在造模同时给药;而本研究是在造模后 3 周开始给药,此时肾间质已开始出现确切的纤维沉积^[16-17],这种干预策略更具临床指导意义。

EMT 是肾间质纤维化发生发展的重要机制^[3]。在肾组织中 EMT 是指肾小管上皮细胞失去细胞间粘附性及自身极性,获得迁移和侵袭能力,进入间质获得肌成纤维细胞表型的过程。肌成纤维细胞迁移并合成大量 ECM 成分导致组织重构,导致肾纤维化的发生发展,此过程伴随黏附蛋白 E-cadherin 表达下调,肌成纤维细胞标志性蛋白 α -SMA 表达上调。TGF- β 1/Smad 信号通路是介导肾间质纤维化的关键通路之一,研究表明该通路的激活在 EMT 的起始和维持中都具有重要作用^[4],Smad3 作为下游信号分子,激活后移位至细胞核内调控靶基因的转录,而 Smad7 则通过与 TGF- β I 型受体 (TR I) 结合对该信号通路起负反馈调节作用^[23]。TRB3 是激酶样蛋白 Tribbles 家族成员之一^[24],具有调节细胞增殖、迁移和形态形成的作用。研究表明 TRB3 是 TGF β 1/Smad 信号通路的一种正性调控因子^[5],能与 Smad3 相互作用并且促进 Smad3 介导的转录调节活性从而促进 α -SMA 表达,抑制 E-cadherin 表达,对 EMT 过程具有正性调控作用。

益气法制剂中黄芪为“益气补中要药”,白术为“益气健脾要药”,两者共奏益气健脾、燥湿利水之效;化瘀法制剂中川芎为“血中之气药”,姜黄“主心腹结积,下气,破血,消痈肿”,两者合用以活血化瘀、行气开郁;化痰法制剂中海藻“主破散结气,痈肿瘰癧坚气”,瓜蒌“涤痰结,止消渴,利大肠消痈肿疮毒”,两者合用以宽胸化痰,软坚散结。益气药黄

芪、白术与化痰药瓜蒌、海藻配伍,能协同发挥益气健脾、化痰散结作用,再与化瘀药川芎、姜黄配伍,共奏益气化瘀化痰之效。益气扶正使津液正常输布、血脉通利,杜绝痰浊与瘀血的生成;化瘀化痰促进已成之“痰凝、瘀血”消散,诸药共用以期达到改善处于“痰浊凝聚、痰瘀互结”病理进程的肾组织结构及功能的目的。已有研究表明本研究所用的部分中药或其有效成分可通过多种途径调节参与纤维化进程的关键因子,发挥抗纤维化作用^[18-22]。

本研究中模型组肾小管萎缩及肾间质纤维化明显,血清 BUN、Scr 明显升高,提示 UUO 造模成功。药物干预后,各组肾小管萎缩及间质纤维化有所减轻,血清 BUN、Scr 也较模型组下降,其中益气化瘀化痰组、替米沙坦组及益气组改善较明显。

本研究中,模型组 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达较假手术组明显上调,表明 UUO 术后存在 TGF- β 1/Smad3 通路的激活;而益气化瘀化痰组、替米沙坦组、益气组及化瘀组 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达则明显下调,提示所对应的药物干预对 TGF- β 1/Smad3 通路存在抑制作用。研究表明 Smad 信号转导过程中,TGF- β I 型受体 (TR I) 磷酸化 Smad2/3 的同时,Smad7 也被活化,通过与 TR I 结合抑制该信号通路的激活^[25-26],在此过程中 Smad7 表达受 Smad3 表达的反馈调节。本研究中各组间 Smad7 mRNA 表达无显著性差异,但其变化趋势与 Smad3 mRNA 基本一致。据此推测本研究所用中药制剂是通过 Smad3 间接对 Smad7 表达产生影响的。

UUO 术后,模型组 TRB3 mRNA 表达明显上调,各药物干预组 TRB3 mRNA 均有下调,其中益气化瘀化痰组、替米沙坦组及益气组下调较为明显。模型组 α -SMA mRNA 表达明显上调,E-cadherin mRNA 表达明显下调,提示 UUO 术后术侧肾小管上皮细胞发生了明显的 EMT;益气化瘀化痰组、替米沙坦组及益气组 α -SMA mRNA 表达明显下调,同时 E-cadherin mRNA 表达明显上调,表明对应的药物干预使 EMT 受到抑制。本研究从 mRNA 及蛋白水平检测了 TGF- β 1 及 EMT 相关的 α -SMA、E-cadherin 表达,两者的变化趋势相符。本研究发现 α -SMA 的表达随 TGF- β 1、TRB3 mRNA 的表达而上调,而 E-cadherin 则相反;花芳等^[27-28]的研究也证实 TRB3 可通过对 TGF- β 1/Smad3 信号通路的活化维持肿瘤细胞间叶状态,促进肿瘤的迁移和侵袭;以上

结果提示 TRB3 参与并促进 TGF- β 1 介导的 EMT 过程,据此推测本研究所用益气化痰化痰中药改善肾间质纤维化的作用可能与抑制 TGF- β 1/Smad3 通路及 TRB3 的表达,进而抑制 EMT 相关。

RIF 是一种多致病因素、多机制参与的病理过程,因此单一靶点药物难以完全阻断或逆转其发生发展。中药多途径、多环节和多靶标的干预策略在治疗中具有一定优势^[29]。本研究也证实益气化痰化痰制剂改善 RIF 的效果优于替米沙坦及单独使用益气、化痰、化痰法制剂,体现了中药复方在疾病治疗中的优势。此外,本研究还显示益气、化痰、化痰三者中,益气制剂改善 RIF 的效果较好,其次为化痰制剂,化痰制剂效果略差,提示在益气化痰化痰制剂对 RIF 的改善中,益气药物可能发挥了更主要的作用,这恰好印证了《黄帝内经》所言:“邪之所凑,其气必虚”“正气存内,邪不可干”,一方面病邪可损耗正气,另一方面补足正气可抗病、祛邪,有利于恢复。综上所述,本研究从作用机制及干预效果两方面探讨了益气、化痰、化痰中药制剂及其合剂对 UUO 介导的肾间质纤维化的影响,为进一步的实验研究及临床用药提供了一定参考。

参 考 文 献

- [1] 刘晓倩,闫军堂,赵宗江,等. 益气活血降浊复方对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 TGF- β 1、 α -SMA、HGF 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2797-2802.
- [2] 秦军燕,王琛. 扶正化痰法防治肾纤维化的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(10): 3180-3183.
- [3] Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 103-116.
- [4] Meng XM, Tang MK, Li J, et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis[J]. Front Physiol, 2015, 6: 82.
- [5] Hua F, Mu R, Liu J, et al. TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 19): 3235-3246.
- [6] Pan B, Liu G, Jiang Z, et al. Regulation of renal fibrosis by macrophage polarization[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(3): 1062-1069.
- [7] Sun GX, Ding R, Li M, et al. Ghrelin attenuates renal fibrosis and inflammation of obstructive nephropathy[J]. J Urol, 2015, 193(6): 2107-2115.
- [8] Yan J, Zhang Z, Jia L, et al. Role of bone marrow-derived fibroblasts in renal fibrosis[J]. Front Physiol, 2016, 7: 61.
- [9] Wang DT, Huang RH, Cheng X, et al. Tanshinone IIA attenuates renal fibrosis and inflammation via altering expression of TGF- β /Smad and NF- κ B signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 26(1): 4-12.
- [10] 高世娇,陈文龙,何英,等. 益气化痰化痰养阴剂对肝纤维化大鼠 FSP1、PAR-2 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 38(8): 1114-1118.
- [11] 李艳,曹文富. 益气化痰化痰养阴剂对肝纤维化大鼠 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34(8): 1437-1442.
- [12] 贺雄,曹文富,赵华利,等. 益气化痰化痰法对肺纤维化大鼠 TGF- β 1、PAI-1 的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(19): 1903-1905.
- [13] 辛冰牧,杨红振,胡卓伟. 肾纤维化发病机制及治疗学研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(5): 349-354.
- [14] 谢盛彬,王伟铭,陈楠. UUO 模型大鼠肾间质纤维化动态进展及 α -SMA、TGF- β 1 和 VDR 表达变化[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(7): 752-757.
- [15] 沈烨渠,周健淞,何立群. 活血祛瘀方对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF- β 1 和 CTGF 表达的影响[J]. 中草药, 2010, 41(11): 1859-1862.
- [16] 谢盛彬,王伟铭,陈楠. UUO 模型大鼠肾间质纤维化动态进展及 α -SMA、TGF- β 1 和 VDR 表达变化[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(7): 752-757.
- [17] 周本宏,周静,梁艺小,等. 石榴皮鞣质改善大鼠肾纤维化作用研究[J]. 中草药, 2014, 45(11): 1585-1590.
- [18] 杨茹茜,徐倩,杨旖,等. 黄芪甲苷对肾纤维化小鼠 Toll/MyD88 依赖性通路的作用研究[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3775-3782.
- [19] 何娟,曹文富,王海洋,等. 川芎含药血清对大鼠肝星状细胞大麻素受体 1 相关信号通路的影响[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1397-1401.
- [20] 刘晓明,朱雪,张伟. 化痰类中药干预肺纤维化模型大鼠肺组织中 Nrf2 含量的研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2081-2084.
- [21] 黄小华,孙永,沈能,等. 双亲姜黄素衍生物减轻大鼠肝纤维化与抗炎抗氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(4): 470-475.
- [22] 秦秀娟,高家荣,姜辉,等. 疏肝健脾方醇水双提物对 CCL₄ 诱导的肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 中成药, 2015, 37(8): 1646-1651.
- [23] 李明亮,杜洁,戴英波. 肾纤维化信号通路的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(18): 3275-3278.
- [24] 刘进稳,辛冰牧,慕容,等. TRB3 在肾纤维化中的表达及其与上皮-间叶转化的关系[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(3): 407-411.
- [25] Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci(Lond), 2013, 124(4): 243-254.
- [26] Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [27] 花芳,余娇娇,孙巍,等. TGF- β /Smad3 信号参与介导 TRB3 的促肿瘤作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 323-327.
- [28] Hua F, Li K, Yu J J, et al. TRB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7951.
- [29] 汪慧琪,魏林,吴伟,等. 中医药治疗慢性肾功能衰竭的系统评价再评价[J]. 中草药, 2014, 45(5): 738-744.

(责任编辑:方济)