

温阳泄浊通络法对慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化的干预作用及其机制研究

张学琴¹, 方敬¹, 赵炳武¹, 吴苏¹, 潘永梅¹, 陈志强^{1,2,3*}

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050020

2. 河北省中医学院附属医院, 河北 石家庄 050017

3. 河北省肝肾病重点实验室, 河北 石家庄 050091

摘要: **目的** 观察温阳泄浊通络法对5/6肾切除所致慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化的干预作用,并探讨其机制。**方法** 32只SD大鼠随机选取8只为假手术组,其余24只行5/6肾切除术制备肾纤维化模型。造模完成后随机分为模型组、温阳泄浊通络法组、尿毒清组,并ig予以相应药物。干预12周后,取肾组织,行HE、PAS染色检测病理损伤程度,行Masson、天狼星红染色检测纤维化程度,并应用免疫荧光、Western blotting法检测I型胶原蛋白及mRNA的表达,应用免疫组化、Western blotting法检测肾小管上皮细胞EMT相关蛋白(α -SMA、Vimentin、E-cadherin)的表达。**结果** 与模型组比较,温阳泄浊通络法可减轻肾脏病理损伤及肾纤维化程度,并显著降低I型胶原蛋白及mRNA的表达;下调 α -SMA、Vimentin的高表达,上调E-cadherin的低表达。**结论** 温阳泄浊通络法可有效减轻慢性肾衰竭大鼠肾损伤、改善肾纤维化,其机制可能与抑制肾小管上皮细胞EMT及I型胶原的表达相关。

关键词: 温阳泄浊通络法; 慢性肾衰竭; 肾间质纤维化; 肾小管上皮细胞EMT; I型胶原; 5/6肾切除

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)09-2133-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.018

Effects of warming yang-dispelling turbidity-dredging collaterals method on renal interstitial fibrosis in rats with chronic renal failure and mechanisms involved

ZHANG Xue-qin¹, FANG Jing¹, ZHAO Bing-wu¹, WU Su¹, PAN Yong-mei¹, CHEN Zhi-qiang^{1,2,3}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050020, China

2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China

3. Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-kidney Patterns, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: Objective To investigate the effects of warming yang-dispelling turbidity-dredging collaterals method on renal interstitial fibrosis in rats with chronic renal failure caused by 5/6 nephrectomy and explore its mechanisms. **Methods** Eight rats were randomly chosen as sham operation group (Sham), while the remaining 24 rats underwent 5/6 nephrectomy were divided into model group (5/6Nx), warming yang-dispelling turbidity-dredging collaterals method group (WDD) and Niaoduqing group (NDQ), and the rats in each group were administrated with corresponding drugs. After the intervention of 12 weeks, all the rats were sacrificed and the kidneys were then removed. HE, PAS Masson, Picrosirius red staining were conducted to assess kidney pathological changes and renal fibrosis. The protein expression of Collagen I was tested by both immunofluorescence and Western blotting, and the mRNA expression was evaluated using qRT-PCR. The expression of protein related with the process of EMT, including α -SMA, E-Cadherin and Vimentin, were tested with immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Compared with the model group, warming yang-dispelling method alleviated kidney pathological injury and renal fibrosis, and significantly down-regulated the protein and mRNA expression of Collagen I. Moreover, warming yang-dispelling turbidity-dredging collaterals method regulated the process of EMT by decreasing the high expression of α -SMA and Vimentin, and increasing the low expression of E-Cadherin. **Conclusion** Warming yang-dispelling turbidity-dredging collaterals method can effectively attenuate renal fibrosis and injury and its underlying mechanisms may be related with its inhibitory effects on Collagen I expression and regulation of EMT.

收稿日期: 2019-02-19

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(14277708D); 河北省研究生创新资助项目(CXZZBS2018158)

作者简介: 张学琴(1987—),女,在读博士,研究方向为慢性肾脏病的中医药治疗及机制研究。Tel: 17332920113 E-mail: qinrong0113@126.com

*通信作者 陈志强(1962—),男,博士生导师,教授,研究方向为中西医结合治疗肾脏疾病。Tel: (0311)69095003 E-mail: chenzhqiang2011@163.com

Key words: warming yang-dispelling turbidity-dredging collaterals method; chronic renal failure; renal interstitial fibrosis; renal tubular epithelial cells EMT; Collagen I; 5/6 nephrectomy

慢性肾衰竭 (CRF) 是在各种慢性肾脏病的基础上缓慢出现肾功能进行性减退直至衰竭的一种临床综合征^[1]。其主要病理改变为肾小球硬化和肾间质纤维化, 是各种原因的慢性肾脏病进展至终末期肾病 (ESRD) 的主要病理基础。以往人们注重肾小球硬化的研究, 但近年来大量研究表明, 与肾小球硬化相比, 肾间质纤维化更易导致 ESRD 的发生, 对患者的预后具有决定作用^[2-3], 并且肾小管上皮细胞间充质转分化 (EMT) 是导致肾间质纤维化的关键因素之一, 在肾间质纤维化的发生发展中发挥着重要作用^[4-6]。

从中医角度分析, 本课题组认为 CRF 的主体病机为脾肾阳虚、湿浊内停、瘀血阻络, 治宜益气温阳、祛湿泄浊、化瘀通络, 因此温阳泄浊通络法为其基本治法^[7-9]。该法已应用于临床多年, 疗效确切^[10]。为进一步明确温阳泄浊通络法的作用靶点和可能的作用途径, 开展温阳泄浊通络法对慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化的干预作用实验研究, 以期为其临床应用推广提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

温阳泄浊通络法所用药物为颗粒剂, 由广东一方制药有限公司生产, 1 g 颗粒相当于 7 g 饮片, 具体组方规格如下: 黄芪 (批号 18111301) 30 g、当归 (批号 1811073) 15 g、川芎 (批号 180904001) 12 g、红花 (批号 181201) 10 g、地龙 (批号 18062001) 12 g、水蛭 (批号 1801082) 6 g、仙茅 (批号 180601) 12 g、仙灵脾 (批号 180703) 15 g、藿香 (批号 181101) 10 g、佩兰 (批号 181001) 10 g、陈皮 (批号 181208) 15 g、白豆蔻 (批号 20181001) 10 g、土茯苓 (批号 190101) 30 g、积雪草 (批号 181101) 30 g; 尿毒清颗粒 (5 g/袋, 批号 20170724) 由康臣药业 (内蒙古) 有限责任公司生产。

1.3 主要试剂

抗 GAPDH 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 抗 α -SMA 抗体 (杭州华安生物技术有限公司); 抗 E-cadherin 抗体 (Gene Tex); 抗 Collagen I 抗体

(Affinity Biosciences); 抗 Vimentin 抗体 (Abcam); 兔 SP 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); BCA 法蛋白定量试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司); Trizol Reagent (Life Technologies 公司); FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (Thermo 公司); FastStart Universal SYBR Green Master (Roche 公司); 引物 (武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.4 仪器

NanoDrop 2000C 紫外分光光度计 (Thermo 公司); 荧光定量 PCR 仪 (ABI); BX63+DP72 正置研究级显微镜 (Olympus 公司); 酶标仪 (Molecular Devices 公司); Odyssey 红外激光扫描仪 (LI-COR); 倒置荧光显微镜 (Nikon 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

32 只大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为假手术组 (8 只) 和造模组 (24 只)。假手术组仅接受腹部切开、剥离肾包膜操作, 肾实质无损伤。造模组大鼠首次切除左肾上下级共约 2/3 左肾, 1 周后切除全部右肾, 2 次共切除约 5/6 肾。造模完成后, 造模组随机分为模型组、温阳泄浊通络法组、尿毒清组。温阳泄浊通络法组及尿毒清组分别 ig 给予温阳泄浊通络颗粒 (3.24 g/kg) 及尿毒清颗粒 (2.25 g/kg), 药物剂量均根据成人临床剂量按照体表面积法计算; 假手术组及模型组 ig 相应体积的生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 12 周。

2.2 观察指标及检测方法

2.2.1 肾脏组织病理染色观察 肾脏组织经 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h 后, 脱水、透明、浸蜡、包埋, 制成 3 μ m 石蜡切片, 按常规方法进行 HE、PAS、Masson、天狼星红染色, 显微镜下观察其改变并采集图像。

2.2.2 免疫组织化学法检测肾脏 α -SMA、E-cadherin 及 Vimentin 蛋白的表达 石蜡切片脱蜡水化后, 经微波修复抗原、3% H₂O₂ 阻断内源过氧化物酶、血清封闭后, 一抗 (α -SMA 1:200、E-cadherin 1:500、Vimentin 1:200) 孵育过夜滴加 HRP 标记的二抗, 显微镜下 DAB 显色, 复染, 封片, 拍照观察。

2.2.3 免疫荧光法检测 I 型胶原蛋白的表达 石蜡切片脱蜡至水, 经抗原修复、自发荧光淬灭后, 依

次滴加一抗 (I 型胶原 1:100)、二抗, DAPI 复染细胞核后封片, 镜检拍照。

2.2.4 Western blotting 法检测 α -SMA、E-cadherin、Vimentin 及 I 型胶原蛋白的表达 以裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 提取冰冻肾组织蛋白质, 并用 BCA 法测定其含量。后经 $5\times$ 上样缓冲液稀释后, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。蛋白上样量为 $20\sim 40\text{ }\mu\text{g}$ 。经电泳、转膜、牛奶封闭、一抗 (α -SMA 1:5 000、E-cadherin 1:1 000、Vimentin 1:5 000、I 型胶原 1:1 000、GAPDH 1:5 000) 孵育过夜、荧光二抗孵育后, TBST 清洗显影。用 Image J 软件分析其灰度值, 并以目的蛋白与 GAPDH 灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

2.2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测肾脏 I 型胶原 mRNA 的表达 Trizol 法提取 RNA, 反转录 cDNA, 按照试剂盒说明进行荧光定量操作。I 型胶原上游引物序列: $5'\text{-AGAGGCATAAAGGGT-CATCGTG-3'}$, 下游引物序列: $5'\text{-AGACCGTTGA-GTCCATCTTTC-3'}$, 引物长度 161 bp。每个样本设 3 个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2.3 统计学方法

数据资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用 SPSS 21.0 进行统计学处理, 方差齐采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验; 方差不齐采用秩和检验, 组间比较采用 Mann-Whitney 法。

3 结果

3.1 各组大鼠肾组织形态学改变

各组大鼠肾组织 HE 染色及 PAS 染色结果 (图 1) 显示, 假手术组未见明显病理改变; 模型组可见系膜细胞及基质增生, 肾小球节段性硬化, 肾小管颗粒空泡变性, 局灶状萎缩, 肾间质局灶状纤维化伴大量淋巴单核细胞浸润, 小动脉壁增厚, 管腔狭窄。与模型组相比, 温阳泄浊通络法组及尿毒清组肾脏损伤程度明显减轻。

3.2 各组大鼠肾纤维化程度的比较

各组大鼠肾组织均 Masson 染色及天狼星红染色结果 (图 2) 皆显示, 假手术组可见少量纤维沉积, 而模型组有大量的胶原沉积于肾间质中, 且温阳泄浊通络法组及尿毒清组胶原纤维沉积较模型组明显减少。

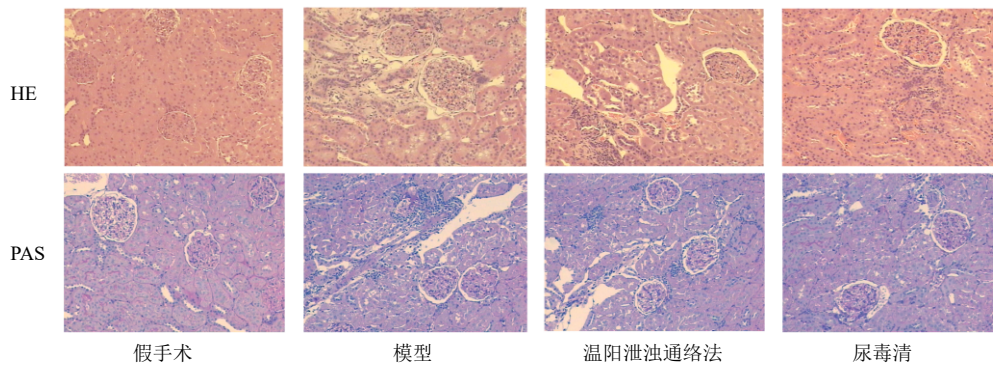


图 1 各组大鼠肾组织病理形态学改变 ($\times 200$)

Fig. 1 Pathological changes of kidneys of rats in each group ($\times 200$)

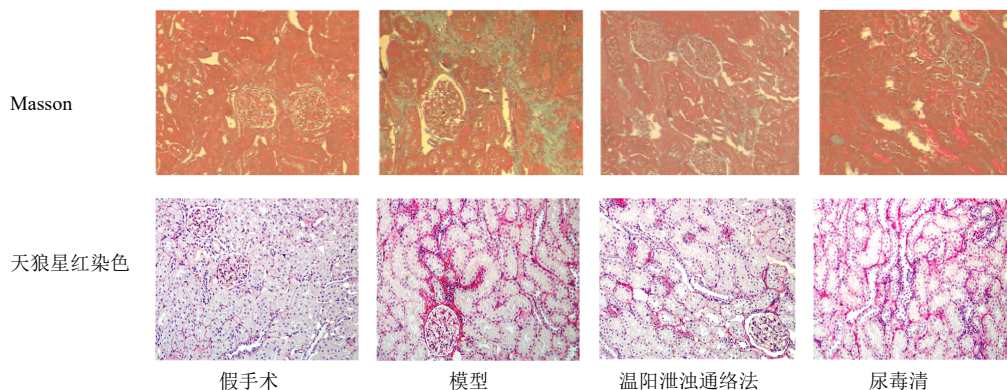


图 2 各组大鼠肾纤维化程度比较 ($\times 200$)

Fig. 2 Comparison of renal fibrosis levels of rats in each group ($\times 200$)

3.3 各组大鼠肾组织 I 型胶原蛋白及 mRNA 表达量的比较

免疫荧光结果 (图 3) 显示, 假手术组仅在肾间质有少量 I 型胶原蛋白的沉积, 而模型组在肾小管间质有大量 I 型胶原蛋白的沉积, 且温阳泄浊通络法组及尿毒清组 I 型胶原蛋白的沉积较模型组明显减少。

Western blotting 结果 (图 3) 显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 I 型胶原蛋白的表达量明显增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 温阳泄浊通络法组及尿毒清组 I 型胶原蛋白的表达量明显减少 ($P < 0.05$), 但两组之间 I 型胶原蛋白的表达量无明显差异。

qRT-PCR 结果 (图 3) 显示, 与假手术组比较,

模型组大鼠 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达量明显增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 温阳泄浊通络法组及尿毒清组 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达量明显减少 ($P < 0.05$); 与尿毒清组相比, 温阳泄浊通络法组 I 型胶原蛋白 mRNA 下降更为明显。

3.4 各组大鼠肾组织 α -SMA、E-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达量的比较

免疫组化结果 (图 4) 显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 α -SMA 及 Vimentin 蛋白表达量明显增多, E-cadherin 蛋白表达量明显减少; 与模型组比较, 温阳泄浊通络法组及尿毒清组 α -SMA 及 Vimentin 蛋白表达量均明显减少, 而 E-cadherin 蛋白表达量均有所提高。

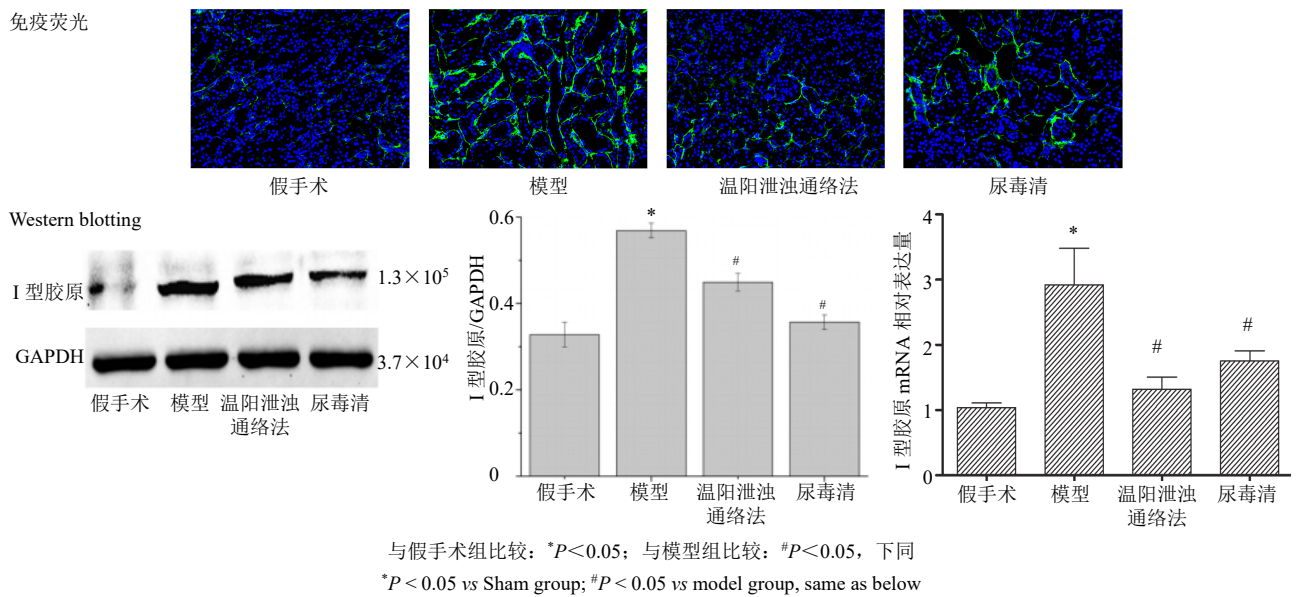


图 3 各组大鼠肾组织 I 型胶原蛋白 mRNA ($n = 8$) 及蛋白 ($n = 3$) 表达水平 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 mRNA ($n = 8$) and protein ($n = 3$) expression of Collagen I in kidney tissue of rats in each group ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$)

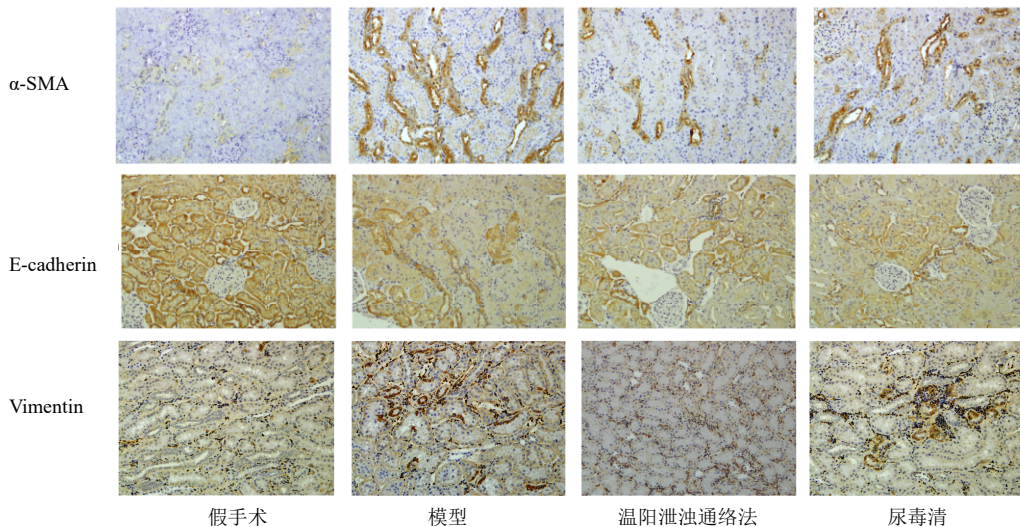


图 4 免疫组化法检测各组大鼠肾组织 α -SMA、E-cadherin 及 Vimentin 蛋白的表达水平 ($\times 200$)

Fig. 4 Protein expression of α -SMA, E-cadherin, and Vimentin in kidney tissue of rats by immunohistochemistry ($\times 200$)

Western blotting 结果 (图 5) 显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 α -SMA 及 Vimentin 蛋白的表达量明显增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 温阳泄浊通络法组及尿毒清组 α -SMA 及 Vimentin 蛋白的表达量均明显减少 ($P < 0.05$), 但两组之间 α -SMA

及 Vimentin 蛋白的表达量均无明显差异。与假手术组比较, 模型组大鼠 E-cadherin 蛋白的表达量明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 温阳泄浊通络法组及尿毒清组 E-cadherin 蛋白的表达量均有所提高 ($P < 0.05$), 但两组之间无明显差异。

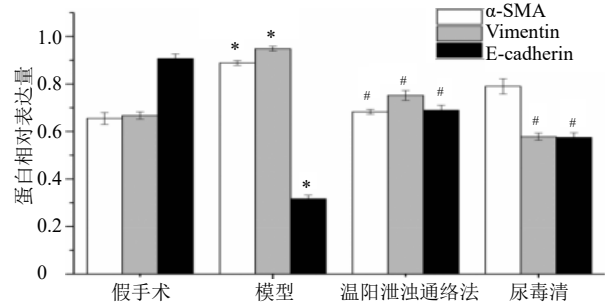
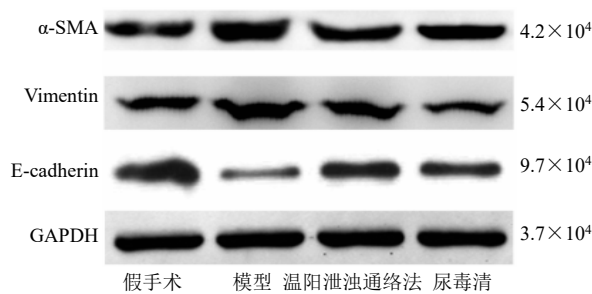


图 5 Western blotting 法检测各组大鼠肾组织 α -SMA、E-cadherin 及 Vimentin 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Protein expression of α -SMA, E-cadherin, and Vimentin in kidney tissue of rats by Western blotting ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

以 CRF 的发病机制、病理改变及临床特征为依据, 结合临床实践, 运用中医理论分析, 本课题组认为 CRF 的主体病机为脾肾阳虚、湿浊内停、瘀血阻络。CRF 早期以脾肾气虚为发病起始, 气虚日久则阳虚为甚。肾主水, 脾主运化水液, 脾肾亏虚则运化不及, 升清降浊功能失常, 致湿浊内停, 壅滞三焦。湿浊之邪易阻碍气机, 使气血运行不畅, 加之“久病必瘀”, 使瘀血贯穿疾病始终。因此提出益气温阳、祛湿泄浊、化瘀通络为 CRF 的基本治法, 简称温阳泄浊通络法。本实验所用温阳泄浊通络颗粒共有 14 味中药组成。其中, 黄芪、仙茅、仙灵脾益气温阳, 鼓动全身气机, 以助气化; 当归、川芎、红花活血化瘀, 并佐以虫类搜剔之品地龙、水蛭, 使络脉得通, 瘀滞尽去。此外, 根据三焦的功能特性及湿浊的致病特点, 提出了三焦分消、祛湿泄浊法, 包括上焦如雾, 宜宣宜散, 应用藿香、佩兰以宣散上焦湿邪; 中焦如沤, 宜运宜化, 应用陈皮、白豆蔻以运化中焦湿浊; 下焦如渌, 宜渗宜利, 应用土茯苓、积雪草以渗利下焦湿浊。诸药合用, 共奏益气温阳、祛湿泄浊、活血化瘀通络之效。本实验证实温阳泄浊通络法可明显减轻 CRF 大鼠的肾脏病理损伤程度。

CRF 的主要病理改变为肾纤维化, 包括肾小球硬化和肾间质纤维化。其中肾间质纤维化与肾功能损害程度及患者预后密切相关, 因此成为目前的研究热点。肾间质纤维化形成的主要环节为细胞外基

质的大量沉积^[11], 而 I 型胶原为细胞外基质的主要成分, 在肾纤维化的发生发展中发挥重要作用^[12]。另有文献证实, 在各种慢性肾脏病中, 受损伤的肾小管上皮细胞可通过 EMT 转化为肌成纤维细胞, 同时引起成纤维细胞及其他肌成纤维细胞的聚集, 导致细胞外基质的大量合成和分泌, 形成肾纤维化, 加速疾病的进展^[13-14]。肾小管上皮细胞 EMT 的特点为上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 的表达减少及间充质细胞标志蛋白 α -SMA、Vimentin 等的表达增加^[15-16]。本实验证实温阳泄浊通络法可显著改善 CRF 大鼠肾间质纤维化的程度; 抑制 I 型胶原蛋白的表达; 并可通过上调 E-cadherin 的低表达、下调 α -SMA、Vimentin 的高表达, 从而抑制肾小管上皮细胞 EMT。

综上所述, 温阳泄浊通络法可改善肾损伤及肾间质纤维化, 其机制可能与抑制 I 型胶原的表达及调控肾小管上皮细胞 EMT 相关。

参考文献

- [1] 王 钢, 陈以平, 邹 燕. 现代中医肾脏病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [2] Farris A B, Colvin R B. Renal interstitial fibrosis: Mechanisms and evaluation [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(3): 289-300.
- [3] Zeisberg M, Neilson E G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(11): 1819-1834.
- [4] Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, et al. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis

- differs among kidney disease models [J]. *Kidney Int*, 2015, 87(1): 233-238.
- [5] Liu Y H. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.
- [6] Wing M R, Ramezani A, Gill H S, *et al*. Epigenetics of progression of chronic kidney disease: Fact or fantasy? [J]. *Semin Nephrol*, 2013, 33(4): 363-374.
- [7] 潘永梅, 郭倩, 贾蕊, 等. 陈志强治疗慢性肾功能衰竭的临床经验 [J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(6): 1207-1208.
- [8] 徐晶, 周旭, 郭倩, 等. 数据挖掘陈志强教授对早中期慢性肾衰竭辨证思路 [J]. *天津中医药*, 2015, 32(12): 712-715.
- [9] 徐晶, 周旭, 郭倩, 等. 数据挖掘陈志强教授治疗早中期慢性肾衰竭用药规律 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2015, 16(12): 1088-1090.
- [10] 郭立芳, 王凤丽, 王月华, 等. 益气通络解毒降浊方结合西医基础疗法治疗早、中期慢性肾功能衰竭疗效观察 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(8): 1042-1045.
- [11] Genovese F, Manresa A A, Leeming D J, *et al*. The extracellular matrix in the kidney: A source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? [J]. *Fibrog Tissue Repair*, 2014, doi: 10.1186/1755-1536-7-4.
- [12] Stefanovic B. RNA protein interactions governing expression of the most abundant protein in human body, type I collagen [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4(5): 535-545.
- [13] Lovisa S, LeBleu V S, Tampe B, *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 998-1009.
- [14] Grande M T, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, *et al*. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 989-997.
- [15] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [16] Saito A. EMT and EndMT: Regulated in similar ways? [J]. *J Biochem*, 2013, 153(6): 493-495.