

## 养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ 、PI<sub>3</sub>K 和 PKB 的影响

蔡曼曼<sup>1</sup>, 龙子江<sup>1\*</sup>, 周宜轩<sup>2</sup>, 丁伯春<sup>1</sup>, 陈 铖<sup>1</sup>, 陆松侠<sup>1</sup>

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038

2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031

**摘要:** 目的 观察养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠肾组织转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI<sub>3</sub>K) 和蛋白激酶 B (PKB) 的影响, 探讨养肝益水颗粒对原发性高血压早期肾损害的作用及机制。方法 取 50 只 12 周龄收缩压大于 150 mmHg 的自发性高血压大鼠, 随机分为模型组, 养肝益水颗粒高、中、低剂量组 (10.8、5.4、2.7 g/kg) 和阳性对照药厄贝沙坦组 (0.015 g/kg), 每组 10 只; 另取 10 只 Wistar 雄性大鼠作为正常对照组, 模型组和正常对照组 ig 给予等量蒸馏水, 每天 1 次, 共 12 周。给药前和给药 12 周后用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组大鼠尿微量白蛋白 (UMA) 浓度; 末次给药后, 用免疫组化法检测各组大鼠肾脏组织中 TGF- $\beta_1$  和 PI<sub>3</sub>K 的表达; 用 ELISA 法检测 PKB 的浓度。结果 养肝益水颗粒有效地降低了 UMA 浓度和肾脏组织 TGF- $\beta_1$ ; 升高了肾脏组织 PI<sub>3</sub>K 和 PKB 水平。结论 养肝益水颗粒对高血压的早期肾损害有一定的抑制作用, 其作用机制可能与影响 TGF- $\beta_1$ 、PI<sub>3</sub>K 和 PKB 的含量有关。

**关键词:** 养肝益水颗粒; 自发性高血压大鼠; 转化生长因子- $\beta_1$ ; 磷脂酰肌醇-3 激酶; 蛋白激酶 B; 尿微量白蛋白

**中图分类号:** R972.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2013) 04 - 0257 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.005

## Effect of Yanggan Yishui Granule on TGF- $\beta_1$ , PI<sub>3</sub>K, and PKB expression in renal tissue of spontaneously hypertensive rats

CAI Man-man<sup>1</sup>, LONG Zi-jiang<sup>1</sup>, ZHOU Yi-xuan<sup>2</sup>, DING Bo-chun<sup>1</sup>, CHEN Cheng<sup>1</sup>, LU Song-xia<sup>1</sup>

1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

2. First Hospital Affiliated to Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

**Abstract: Objective** To observe the effects of Yanggan Yishui Granule (YYG) on transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), phosphatidylinositol-3-kinase (PI<sub>3</sub>K), and protein kinase B (PKB) in spontaneously hypertensive rats (SHR), and to explore the underlying mechanisms of YYG in preventing and treating early renal damage. **Methods** Fifty 12 weeks-old male SHR with the systolic blood pressure > 150 mmHg were randomly divided into the model group, the high-, mid-, and low-dose (10.8, 5.4, and 2.7 g/kg) YYG groups, and the positive control (Irbesartan 15 mg/kg) group, 10 SHR in each group. Another ten Wistar rats were included as the control group. Rats in model and control groups were given the same volume of distilled water once daily for 12 weeks. At pre-administration and after successive administration for 12 weeks, urine microalbumin (UMA) concentration was measured by ELISA; after the last administration, the levels of TGF- $\beta_1$  and PI<sub>3</sub>K in liver tissue were determined by immunohistochemistry and PKB was detected by ELISA. **Results** YYG decreased UMA concentration and TGF- $\beta_1$  in kidney, and increased PI<sub>3</sub>K and PKB levels in kidney. **Conclusion** YYG inhibites the early renal damage of SHR which might be related to its regulation on TGF- $\beta_1$ , PI<sub>3</sub>K, and PKB contents.

**Key words:** Yanggan Yishui Granule; spontaneously hypertensive rats; transforming growth factor- $\beta_1$ ; phosphatidylinositol-3-kinase; protein kinase B; urine microalbumin

目前全球约有 10 亿成年人患有高血压<sup>[1]</sup>, 高血压病的患病率高而且起病隐匿, 受遗传和后天环境的共同影响<sup>[2]</sup>, 是影响心血管疾病发病率和死亡率的重要因素<sup>[3]</sup>。高血压最大的危害是能导致病人脑、心脏和肾脏等重要脏器的一系列病变, 其中肾脏为

主要受累的靶器官之一, 即可造成肾脏损害, 而各种原因造成的肾脏损害又会加重高血压<sup>[4]</sup>。

中医理论认为高血压肾损害主要病理基础是肝肾阴虚、肾虚血瘀, 故在治疗过程中应以补肝肾益、活血通络为基本原则。养肝益水颗粒 (Yanggan

收稿日期: 2013-04-15

基金项目: 康缘中医药科技创新基金项目 (2010HZ020)

作者简介: 蔡曼曼 (1987—), 女, 硕士研究生, 从事中药对心脑血管疾病防治作用的研究。Tel: 13655512079 E-mail: cmm20100701@163.com

\*通信作者 龙子江 (1957—), 男, 教授, 从事中药对心脑血管疾病防治作用的研究。Tel: (0551)5169216 E-mail: lzjyls@163.com

Yishui Granule, YYG, 主要组成为枸杞子、黄芪、菟丝子、怀牛膝等)是安徽中医学院第一附属医院心内科周宜轩主任医师在长期临床经验的基础上,结合现代药理研究成果,拟方制成的颗粒剂,并进行中医症候与早期肾损害指标相关性研究。临床研究已经证实该方对高血压早期肾损害有一定的改善作用<sup>[5-6]</sup>。本实验通过观察养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)的肾组织转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、磷脂酰肌醇-3激酶(PI<sub>3</sub>K)和蛋白激酶B(PKB)含量的影响,探究养肝益水颗粒保护肾脏的作用及作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

雄性 SHR 和 Wistar 大鼠, 12 周龄, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司; 许可证编号 SCXK(京)2012-0001, 合格证号 0261977。

### 1.2 药品与试剂

养肝益水颗粒, 购于安徽中医学院第一附属医院, 批号 20110804; 厄贝沙坦片, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号 11121251; 水合氯醛, 国药集团化学试剂有限公司生产, 批号 20100304; MA 和 PKB 试剂盒, 上海源叶生物技术有限公司, 批号分别为 11528R 和 10778R; TGF- $\beta_1$  和 PI<sub>3</sub>K 多克隆抗体, SP 二抗试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

BP—6 型动物无创血压测试仪, 成都泰盟科技有限公司; BL—820 型生物机能实验系统, 成都泰盟科技有限公司; Centrifuge5417R 型离心机; ALC210 型电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; iMARK 型酶标仪; Leica2135 型石蜡切片机; BM—II 型病理组织包埋机, 安徽省电子科学研究所; 88—1 大功率磁力搅拌器; QT—1 漩涡混合器, 上海琪特分析仪器有限公司; Nikon80 荧光显微镜, 新飞达光学仪器公司。

## 2 方法

### 2.1 动物的分组及给药

取 12 周龄雄性 SHR 65 只和 Wistar 大鼠 15 只, 进行适应性饲养 1 周后, 用动物无创血压测试仪测量收缩压, 取 50 只收缩压大于 150 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 的 SHR, 按血压分层随机分为 5 组, 即模型组、阳性对照药厄贝沙坦组(15 mg/kg)、养肝益水颗粒高、中、低剂量组(10.8、5.4、2.7 g/kg),

每组 10 只; 取 10 只收缩压小于 120 mmHg 的 Wistar 雄性大鼠作为正常对照组。给药容积为 0.2 mL/kg, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 12 周。

### 2.2 检测指标

**2.2.1 尿微量白蛋白(UMA)的检测** 于给药前和第 12 周给药后用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 吸取 2 mL, 用 ELISA 法检测 UMA 的浓度。

**2.2.2 肾脏组织 TGF- $\beta_1$ 、PI<sub>3</sub>K 和 PKB 的检测** 末次给药后 1 h, 用 3.5% 水合氯醛麻醉大鼠, 取一侧肾脏放入 10% 中性甲醛中固定保存, 用免疫组化法检测 TGF- $\beta_1$  和 PI<sub>3</sub>K 的量; 取另一侧肾脏匀浆, 离心, 取上清液, 用 ELISA 法检测 PKB 的量。

### 2.3 统计方法

应用 SPSS17.0 软件进行统计分析处理。所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 养肝益水颗粒对 SHR 中 UMA 的影响

给药前, SHR 模型组与正常对照组比较, UMA 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 说明模型成立, 按剂量连续给药 4、8、12 周后, 模型组 UMA 的量增加, 且随时间延长而增加, 用药各组 UMA 量减少, 且随时间延长, 没有明显增加, 与模型组比较, 差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 说明模型组随时间延长肾脏损害加重, 各用药组含量没有明显增加, 说明养肝益水颗粒对 SHR 肾脏有明显的保护作用。结果见表 1。

### 3.2 养肝益水颗粒对 SHR 肾脏中 TGF- $\beta_1$ 和 PI<sub>3</sub>K 的影响

免疫组化结果显示, 模型组大鼠肾小管中有密集的棕黄色颗粒, TGF- $\beta_1$  呈高表达, 各给药组无表达或极弱表达, 与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ); PI<sub>3</sub>K 在模型组表达较弱, 与模型组比较, 各用药组表达升高, 其中高剂量组差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 低剂量组和阳性对照组差异明显 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2, 图 1、2。

### 3.3 养肝益水颗粒对 SHR 肾脏中 PKB 浓度的影响

与正常组比较, 模型组 PKB 浓度明显下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 养肝益水颗粒各给药剂量组的 PKB 浓度显著上升, 具有统计学意义, 其中中剂量组差异极显著 ( $P < 0.01$ )、高剂量组和低剂量组差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

## 4 讨论

SHR 的自发性高血压与人类高血压疾病的病理

表1 养肝益水颗粒对SHR尿微量白蛋白含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of YYG on UMA level in SHR ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	UMA / (μg·mL <sup>-1</sup> )			
		给药前	给药4周	给药8周	给药12周
正常对照	—	6.72 ± 1.53**	7.01 ± 1.79**	7.70 ± 1.49**	8.14 ± 1.68**
模型	—	16.37 ± 1.57	23.61 ± 1.93	30.55 ± 3.11**	37.51 ± 3.85
养肝益水颗粒	10.8	16.08 ± 1.37	18.81 ± 1.51**	17.20 ± 2.02**	17.80 ± 2.71**
	5.4	16.36 ± 1.72	19.98 ± 1.87**	19.24 ± 2.38**	19.34 ± 2.39**
	2.7	16.40 ± 1.38	21.13 ± 1.76**	20.47 ± 2.96**	21.29 ± 2.66**
阳性对照	0.015	16.30 ± 1.80	16.91 ± 1.30**	15.93 ± 2.71**	16.55 ± 2.26**

与模型组比较: \*\*P<0.01

\*\*P<0.01 vs model group

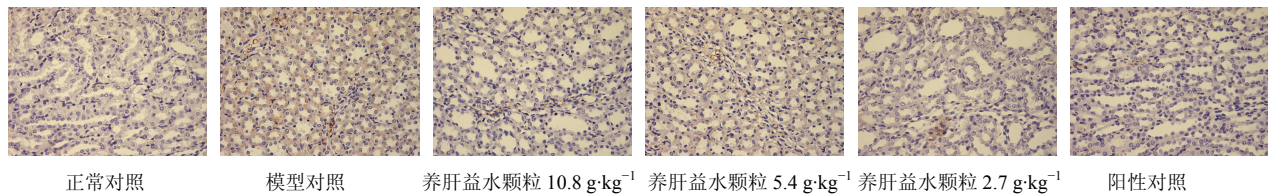


图1 各组大鼠肾小管TGF-β1的表达

Fig. 1 Expression of TGF-β1 in renal tubule of rats in each group

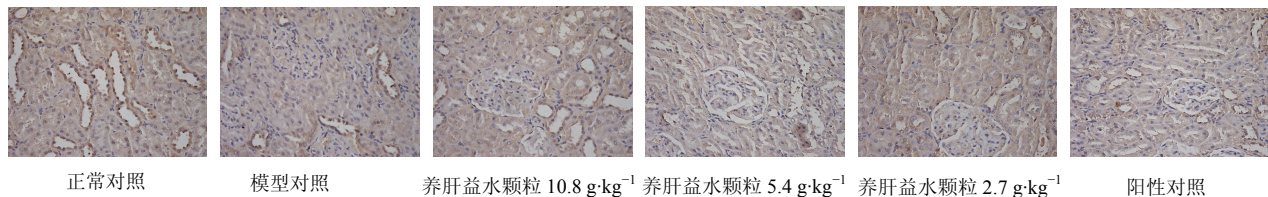


图2 各组大鼠肾小管PI3K的表达

Fig. 2 Expression of PI3K in renal tubule of rats in each group

表2 养肝益水颗粒对SHR肾组织中TGF-β1、PI3K和PKB的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of YYG on TGF-β1, PI3K, and PKB in kidney of SHR ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	平均光密度		PKB / (pg·mL <sup>-1</sup> )
		TGF-β1	PI3K	
正常对照	—	0.163 7 ± 0.031 8*	0.438 ± 0.005*	436.3 ± 30.95*
模型	—	0.288 6 ± 0.064 5	0.377 ± 0.015	381.3 ± 73.47
养肝益水颗粒	10.8	0.239 5 ± 0.009 1*	0.443 ± 0.008**	445.9 ± 26.06*
	5.4	0.231 6 ± 0.103 5*	0.430 ± 0.027	481.5 ± 62.72**
	2.7	0.209 7 ± 0.030 2*	0.434 ± 0.017*	441.7 ± 71.51*
阳性对照	0.015	0.192 5 ± 0.068 0*	0.437 ± 0.010*	400.9 ± 44.18

与模型组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs model group

生理机制相似,是目前应用最广泛的高血压模型<sup>[7]</sup>。肾脏与高血压关系密切,既是血压的重要调节器官又是高血压损害的主要靶器官之一。但由于肾脏具有自我调节作用,在高血压肾脏病变的早期,临床上除夜尿增多外通常无明显症状,易被患者忽视,常规反映肾功能的各项血、尿检查(血肌酐、尿素氮、尿常规)均正常,但肾小球、肾小管功能可能

已有所减退,肾脏的储备功能已经下降,而此时患者尿中的UMA会增加,出现微量白蛋白尿<sup>[8]</sup>,因此UMA可作为高血压患者肾损害的早期敏感指标,对高血压肾病的早期诊断有重要价值<sup>[9]</sup>。尤其是24hUMA定量在临床上意义更大,并可以将此项检查用于识别需要进行预防和治疗的患者<sup>[10]</sup>。本研究发现给药12周后模型组大鼠UMA含量已经显

著升高,而各给药组的 UMA 含量受到药物的调节,上升幅度不大,这说明养肝益水颗粒对高血压早期肾损害有一定的抑制作用。

TGF- $\beta_1$  是目前公认的最主要的肾脏促纤维化因子<sup>[11]</sup>,在肾间质纤维化过程中起重要作用。大量研究证实,TGF- $\beta_1$ 在肾脏组织的表达水平较高,在肾小球和肾小管间质纤维化发生发展中起重要作用。高血压肾病患者肾小球肥大由 TGF- $\beta_1$ 介导<sup>[12]</sup>,TGF- $\beta_1$ 可以刺激系膜细胞产生蛋白多糖和合成细胞外基质,抑制 TGF- $\beta_1$ 的表达将能延缓肾小球硬化的发生发展。在动物模型中,有直接的证据表明 TGF- $\beta_1$ 加速肾小球肾炎及肾小球硬化的发展,而抑制 TGF- $\beta_1$ 的表达将能减轻肾脏病变<sup>[13]</sup>,高血压又可促进组织 TGF- $\beta_1$ 的高表达<sup>[14]</sup>。本研究结果表明,模型组 TGF- $\beta_1$ 表达增高,即随着肾脏损害的加重而增高;与模型组比较,各给药组明显降低,这也说明养肝益水颗粒对肾脏有保护作用。

近年来,TGF- $\beta_1$ 非 Smad 信号通路已逐渐受到关注<sup>[15]</sup>,研究显示 PI<sub>3</sub>K 是 TGF- $\beta_1$ 重要的下游信号分子之一,PI<sub>3</sub>K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,是一种重要的信号酶,TGF- $\beta_1$ 通过直接或间接方式调节 PI<sub>3</sub>K 的表达水平,在部分病理生理过程及细胞类型中表现为对 PI<sub>3</sub>K 的负性调节作用,PI<sub>3</sub>K 最重要的下游因子之一 PKB 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[16]</sup>,研究发现活化 PKB 能防止上皮细胞凋亡和坏死、维持肾小管结构及功能的完整性<sup>[17]</sup>,PI<sub>3</sub>K-PKB 通路可以促进细胞的生长和生存<sup>[18]</sup>。本研究发现,养肝益水颗粒可以下调 UMA 和 TGF- $\beta_1$ 的含量并使 PI<sub>3</sub>K 和 PKB 的含量上升,说明养肝益水颗粒对肾脏有保护作用,但其是否通过影响 TGF- $\beta_1$ 而非 Smad 信号通路来发挥保护肾脏作用目前尚不清楚,有待进一步的研究证实。

#### 参考文献

- [1] Padmanabhan S, Newton-Cheh C, Dominiczak A F. Genetic basis of blood pressure and hypertension [J]. *Trends Genet*, 2012, 28(8): 397-408.
- [2] Poudel B, Yadav B K, Nepal A K, et al. Prevalence and association of microalbuminuria in essential hypertensive patients [J]. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(8): 331-335.
- [3] Shuster J E, Bleske B E, Dorsch M P. Clinical utility of azilsartan-chlorthalidone fixed combination in the management of hypertension [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2012, (8): 381-387.
- [4] Miana M, de Las H N, Rodriguez C, et al. Effect of eplerenone on hypertension-associated renal damage in rats: potential role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma) [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2011, 62(1): 87-94.
- [5] 戴小华,王波,杨帆,等.养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠血浆 Ang II、TGF- $\beta_1$ 、CTGF 含量和肾皮质 Ang II、TGF- $\beta_1$ 、CTGF mRNA 表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(3):371-372.
- [6] 王波,戴小华,杨帆,等.养肝益水颗粒对自发性高血压大鼠肾脏 Smad2、Smad3、Smad7 表达的影响 [J]. *安徽中医学院学报*, 2011, 30(5): 59-62.
- [7] 卞海,龙子江,陈明,等.无患子皂苷对原发性高血压大鼠的影响 [J]. *中成药*, 2009, 31(3): 367-369.
- [8] 吴彩兰,白庆双.尿微量白蛋白检测老年高血压早期肾损害的临床意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(7): 1234-1235.
- [9] Basi S, Fesler P, Mimran A, et al. Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander? [J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(Suppl 2): S194-S201.
- [10] 王丹枫,方祝元.高血压早期肾损害实验室指标与中医辨证分型的相关性 [J]. *北方药学*, 2011, 8(3): 58-59.
- [11] Border W A, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 1-7.
- [12] 宋国华.普伐他汀对高血压肾病患者血清 TGF- $\beta_1$  的影响 [J]. *山东医药*, 2006, 46(25): 49-50.
- [13] 史伟,梁馨苓,刘双信,等.转化生长因子  $\beta_1$  反义 RNA 对肾小球系膜细胞基质合成及分泌的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2002, 18(2): 103-106.
- [14] 李芝,王超云,张树平,等.罗布麻叶总黄酮对高脂高盐大鼠高血压的影响及其分子机制 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 540-545.
- [15] Zhang Y E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling [J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 128-139.
- [16] 周娟,房向东,涂卫平. PI3K/AKT 通路在红细胞生成素肾保护中的作用 [J]. *生命的化学*, 2012, 32(3): 249-253.
- [17] Dai C, Yang J, Liu Y. Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2): 411-422.
- [18] Courtney K D, Corcoran R B, Engelman J A. The PI3K pathway as drug target in human cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(6): 1075-1083.