

大黄-丹参药对对慢性肾衰竭大鼠结肠黏液屏障功能的影响

王 宏, 江 茜, 康 利, 袁 玲, 崔晓雪, 陈 冠, 王璐瑶, 王 蕾*

天津市医药科学研究所 心脑血管药物研究室, 天津 300020

摘要: 目的 研究大黄-丹参药对对慢性肾衰竭(CRF)模型大鼠结肠黏液屏障功能的影响。方法 70只雄性Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组、尿毒清颗粒组($2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和大黄-丹参药对高、低剂量组(生药 6.0 、 $3.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组14只。除假手术组外, 其余各组大鼠采用5/6肾切除法制备CRF模型。连续ig给药12周后, 腹主动脉取血测定血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白细胞介素(IL)- 1β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; 剖取残存肾脏和结肠组织, HE和Masson染色观察大鼠肾组织形态学和纤维化改变; 阿利新蓝-过碘酸-雪夫(AB-PAS)染色观察结肠黏液层厚度和杯状细胞数量变化; 免疫组化观察大鼠结肠组织黏蛋白2(Muc2)阳性表达; 采用实时荧光定量(qRT-PCR)法和蛋白免疫印记(Western blotting)法检测大鼠结肠组织Muc2的mRNA和蛋白表达情况。结果 与假手术组相比, 模型组大鼠血清Scr、BUN、IL- 1β 、IL-6和TNF- α 水平明显升高($P<0.01$); 肾组织中肾小球硬化、肾小管扩张, 肾间质可见炎性细胞浸润和纤维化, 纤维化评分显著增加($P<0.01$); 结肠黏液层变薄, 杯状细胞减少; 结肠组织Muc2阳性表达降低, 结肠组织Muc2的mRNA和蛋白表达水平均降低($P<0.01$)。与模型组比较, 大黄-丹参药对高、低剂量组能显著降低模型大鼠血清Scr、BUN、IL- 1β 、IL-6和TNF- α 水平($P<0.01$); 肾组织形态明显改善, 肾纤维化评分显著降低($P<0.01$); 结肠黏液层厚度增加, 杯状细胞增多; 结肠组织Muc2阳性表达升高, 结肠组织Muc2的mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。结论 大黄-丹参药对能够有效保护CRF大鼠的残存肾功能, 延缓CRF进展; 其机制可能与恢复CRF大鼠结肠黏液屏障功能, 改善机体炎症状态有关。

关键词: 大黄-丹参药对; 慢性肾衰竭; 肠黏液屏障; 黏蛋白2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)04-0746-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.008

Effects of *Rheum palmatum*-*Salvia miltiorrhiza* drug pairs on colonic mucus barrier function in chronic renal failure rats

WANG Hong, JIANG Qian, KANG Li, YUAN Ling, CUI Xiaoxue, CHEN Guan, WANG Luyao, WANG Lei

Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Research Laboratory, Tianjin Institute of Medical & Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To study the effects of *Rheum palmatum*-*Salvia miltiorrhiza* drug pairs (RS) on colonic mucus barrier function in rats with chronic renal failure (CRF). **Methods** Seventy male Wistar rats were randomly divided into sham-operation group, model group, Niaoduqing Granule ($2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, RS high and low dose groups ($6, 3\text{ g crude drug}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 14 rats in each group. Except the sham-operation group, the CRF models were replicated by 5/6 nephrectomy. After continuous ig administration for 12 weeks, the levels of serum creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), interleukin (IL)- 1β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α were measured with blood collected from abdominal aorta. The remaining kidney and colon tissue were dissected, the changes of renal histology and fibrosis were observed by HE and Masson staining. The changes of mucous layer thickness and goblet cell number in colon were observed by AB-PAS staining. The positive expression of Muc2 protein in colon tissues of rats was observed by immunohistochemistry. The expressions of Muc2 mRNA and protein in colon tissues was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Compared with sham-operation group, the levels of serum Scr, BUN, IL- 1β , IL-6 and TNF- α of rats in model group were significantly increased ($P<0.01$), glomerular sclerosis, renal tubule dilation, inflammatory cell infiltration and fibrosis were observed in renal interstitium, and the fibrosis score was significantly increased ($P<$

收稿日期: 2024-02-11

基金项目: 天津市卫生健康委员会天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(2021163)

第一作者: 王 宏(1986—), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为药理学。E-mail: wh19860906@126.com

*通信作者: 王 蕾(1979—), 女, 硕士研究生, 研究员, 研究方向为医药研究(药理)。E-mail: zws9905@sina.com

0.01), the mucus layer of colon was thinner and the number of goblet cells were reduced, the positive expression of Muc2 in colon tissue were decreased, and the expression levels of Muc2 mRNA and protein in colon tissues were decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, RS could significantly reduce the levels of serum Scr, BUN, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in high and low dose groups ($P < 0.01$), the renal tissue morphology was significantly improved, and the renal fibrosis score was significantly decreased ($P < 0.01$), the thickness of colon mucus layer increased and the number of goblet cells increased, the positive expression of Muc2 in colon tissue were increased, the expression level of Muc2 mRNA and protein in colon tissues were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** RS could effectively protect the residual renal function of CRF rats and delay the progression of CRF. The mechanism might be related to the restoration of colonic mucus barrier function and improvement of inflammatory state of CRF rats.

Key words: *Rheum palmatum-Salvia miltiorrhiza* drug pairs; chronic renal failure; colonic mucus barrier; Muc2

慢性肾衰竭(CRF)是各种病因引起的肾实质损害和进行性恶化的结果,病损累及多个系统。炎症反应在导致肾功能衰竭的组织损伤中起着关键作用^[1]。“肠-肾轴”理论阐述了肠道屏障功能在改善CRF炎症状态中的重要作用^[2]。肠黏液屏障作为肠道屏障的第一道防线,能够有效阻止细菌与肠上皮组织的直接接触,避免炎症产生^[3]。这种保护性的黏液层是由杯状细胞产生和分泌的黏蛋白组成的,主要成分为黏蛋白2(Muc2)^[4]。

大黄-丹参药对是中医临床治疗慢性肾脏病的高频药对,二者合用具有化瘀泄浊的功效^[5]。本课题组前期实验证实大黄-丹参药对能够降低CRF大鼠血清肠源性尿毒素水平,改善其肠上皮屏障功能^[6]。但对大黄-丹参药对能否保护CRF结肠黏液屏障未做研究。因此,本实验在前期研究基础上,探讨大黄-丹参药对对CRF大鼠结肠黏液屏障的保护作用,为大黄-丹参药对的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

70只SPF级雄性Wistar大鼠,体质量200~220g,购自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(京)2021-0006。大鼠饲养于天津市医药科学研究所动物房屏障环境内,温度20~26℃,相对湿度40%~70%,12h光照/12h黑暗,动物使用许可证号SYXK(津)2021-0005。本实验获得天津市医药科学研究所实验动物伦理委员会批准(批准文号IMPS-EAEP-Z-S202017-01)。

1.2 药物与主要试剂

大黄、丹参饮片[达仁堂(天津)中药饮片有限公司,批号分别为202047-1、G2005018-01],由天津市医药科学研究所陈冠副研究员鉴定均为正品,符合《中国药典》2020年版规定,分别为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 和唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎。尿毒清颗粒(无

糖型)[康臣药业(内蒙古)有限责任公司生产,批号20200524,每袋5g];注射用青霉素钠[哈药集团制药总厂生产,批号18020402-2,规格0.48g(按C₁₆H₁₇N₂NaO₄S计)];戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号020919);明胶海绵(江西众强实业有限公司,批号20190328);白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(上海酶联,批号2022.12、2022.12、2022.12);Masson三色染色液、爱先蓝-糖原(AB-PAS)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号C201202、C210601);BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20220102、2310006);兔一抗Muc2、GAPDH[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号B11A023、714A027];山羊抗兔二抗(CST公司,批号7074S);TRIzol Reagent、HiFiScript cDNA Synthesis kit、UltraSYBR Mixture(北京康为世纪生物科技有限公司,批号03877/15322、33020、30506)。

1.3 主要仪器

单级微手术电凝器(武汉春光医疗美容仪器有限公司);7080型全自动生化仪(日本积水医疗科技有限公司);EG1150H型自动生物组织包埋机、RM2255型切片机(德国Leica仪器有限公司);Ci-L型显微镜(日本Nikon公司);Infinite M2000型酶标仪(瑞士TECAN公司);Mini PROTEAN Tetra型电泳仪(美国Bio-Rad公司);ImageQuant LAS 500型一体化成像仪(美国GE公司);ABI7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

2 方法

2.1 浸膏制备

大黄、丹参各取1000g,加8倍量水煎煮2次,滤过,合并滤液,水浴锅加热浓缩,1g浸膏相当于1.89g生药。采用高效液相色谱法(HPLC)对浸膏中的大黄素和大黄酚成分进行含量测定,二者质量分数总计不少于0.18%。

2.2 动物分组、造模及给药

70只大鼠适应性饲养1周后,随机分为假手术组、模型组、尿毒清颗粒($2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,由临床等效剂量换算)组和大黄-丹参药对高、低剂量($6.0,3.0\text{ g生药}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组14只。除假手术组(仅分离肾组织,并不切除)外,其余各组大鼠采用5/6肾切除法复制CRF大鼠模型。术前2 h im青霉素钠(每只 0.3 mL)预防感染,再ip戊巴比妥钠($45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,消毒手术区。大鼠先行右侧2/3肾切除术:找出右肾,剥离肾膜,以止血钳夹住右肾的肾蒂,剪去右肾的上1/3和下1/3,先用电凝器将切面有效止血,再用明胶海绵吸附止血后,将剩余右肾平稳放回腹腔,逐层缝合。1周后大鼠再行左肾全切术:用3-0手术线结扎左肾肾蒂,切去左肾。各组大鼠于第2次术后1周,眼眶采血,测定血清中肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)含量,当二者水平较假手术组明显升高时,表明大鼠CRF造模成功,开始ig给药。各给药组大鼠ig相应药物,假手术组和模型组大鼠ig等体积纯净水,体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次,连续12周。

2.3 标本采集

末次给药24 h后,大鼠ip戊巴比妥钠($45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉后,腹主动脉取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置2 h后, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离血清用以检测IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平;剖取各组大鼠肾组织,10%中性甲醛固定,用于HE和Masson染色;剖取结肠,部分10%中性甲醛固定,用于阿利新蓝-过碘酸-雪夫(AB-PAS)和免疫组化染色,部分 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,用于Western blotting和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测。

2.4 大鼠血清Scr和BUN含量的检测

取“2.3”项下采集的血清样本,采用全自动生化分析仪检测血清中Scr和BUN水平。

2.5 HE和Masson染色观察大鼠肾组织形态学和纤维化改变

将“2.3”项下10%中性甲醛固定好的肾组织脱水,石蜡包埋后切片,HE染色观察大鼠肾组织形态学变化,Masson染色观察大鼠肾纤维化程度并评分。随机选取10个视野200倍显微镜下观察,按下列标准对肾纤维化进行评分:按病变面积占该视野的百分比计算,无计0分、小于25%计1分、25%~50%计2分、大于50%计3分^[7]。

2.6 酶联免疫吸附法检测

取“2.3”项下采集的血清样本,按ELISA试剂盒说明书,测定大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。

2.7 AB-PAS染色观察大鼠结肠黏液层和杯状细胞

将“2.3”项下10%中性甲醛固定好的结肠组织制备成石蜡切片,按说明书步骤进行AB-PAS染色。先滴加阿利新蓝染色20 min,水洗后滴加高碘酸染液室温孵育10 min,洗片后再滴加雪夫试剂,最后加苏木素染液,流水冲洗,待干后显微镜观察并拍照。

2.8 免疫组化法检测大鼠结肠组织Muc2阳性表达

将制备好的结肠组织石蜡切片置于烘箱 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片2 h,常规脱蜡,抗原修复后,PBS洗3次。切片上滴加山羊血清封闭液,室温封闭20 min后,滴加一抗(Muc2,1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS洗3次后,滴加二抗(IgG,1:500),室温孵育30 min。DBA染液显色,苏木素染液复染,封片。显微镜观察并拍照,黄褐色沉积者为阳性。采用Image Pro-Plus 6.0软件分析阳性染色的平均光密度(IOD)值以表示其表达水平。

2.9 qRT-PCR法检测大鼠结肠组织Muc2 mRNA表达

用TRIzol试剂提取“2.3”项下冻存结肠组织的总RNA,测定总RNA浓度。进行逆转录,获得cDNA。取cDNA进行PCR扩增。PCR反应体系($20\text{ }\mu\text{L}$)包括: $2\times\text{UltraSYBR Mixture }10\text{ }\mu\text{L}$,上下游引物各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$,cDNA和ddH $_2\text{O}$ 共 $8.4\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,40个循环。溶解条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s。以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算Muc2 mRNA的相对表达。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及引物长度见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	序列(5'→3')	引物长度/bp
Muc2	上游 CCTTCCTCTGTGCTTATCTGCTGTG	87
	下游 GGTGTCTCCGTATGTGCCGTTG	
GAPDH	上游 ACGGCAAGTTCAACGGCACAG	129
	下游 CGACATACTCAGCACCAGCATCAC	

2.10 Western blotting法检测大鼠结肠组织Muc2蛋白表达

提取“2.3”项下冻存结肠组织的总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。蛋白变性后进行SDS-PAGE分离,并转移到PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,加入Muc2(1:1 000)和内参

GAPDH(1:500),于4℃孵育过夜。次日洗膜后加入二抗(1:2 000),摇床孵育2 h。再次洗膜后,加发光底物显色(1:1),凝胶成像系统拍照。采用Image J软件分析灰度值,以Muc2蛋白条带与GAPDH条带的灰度值之比表示目的蛋白的表达水平。

2.11 统计分析

采用GraphPad Prism 6.0和SPSS 19.0软件进行数据的统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用LSD-*t*检验。

3 结果

3.1 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠血清Scr和BUN水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清Scr和BUN水平均明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,尿毒清颗粒组和大黄-丹参药对高、低剂量组大鼠血清Scr和BUN水平均显著降低($P < 0.01$),见表2。

3.2 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠肾组织形态学和纤维化的影响

HE和Masson染色结果显示,假手术组大鼠肾

表2 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠血清Scr和BUN水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of RS on levels of Scr and BUN of serum in CRF rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Scr/ (μmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)
假手术	—	57.6±2.3	7.3±0.7
模型	—	154.6±26.8**	27.1±3.9**
尿毒清颗粒	2.5	87.2±8.6##	14.1±1.7##
大黄-丹参药对	6.0	95.2±5.1##	15.5±1.8##
	3.0	106.1±9.9##	19.7±2.1##

与假手术比较: ** $P < 0.01$;与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs sham-operation group; ## $P < 0.01$ vs model group.

小球正常,肾小管上皮完整,未见变性、坏死及管型,肾间质未见炎症细胞浸润和纤维化;模型组大鼠部分肾小球硬化,肾小管扩张,肾间质可见炎症细胞浸润和纤维化;与模型组相比,尿毒清颗粒组和大黄-丹参药对高、低剂量组大鼠肾间质炎症细胞浸润和纤维化均有不同程度减轻。见图1、2和表3。

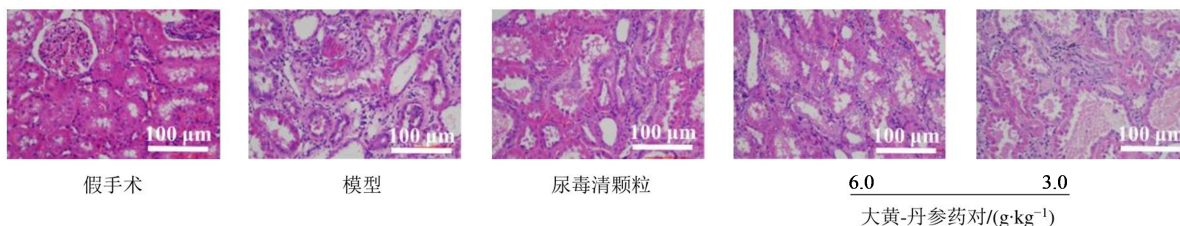


图1 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠肾组织形态学和纤维化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of RS on histopathological changes and fibrosis of renal tissue in CRF rats (HE, ×200)

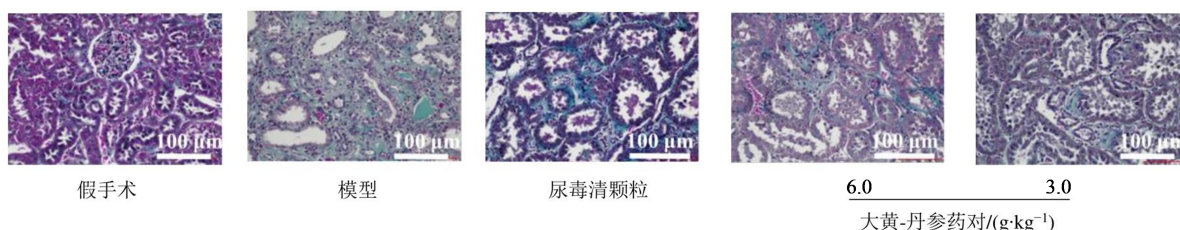


图2 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠肾组织形态学和纤维化的影响(Masson,×200)

Fig. 2 Effect of RS on histopathological changes and fibrosis of renal tissue in CRF rats (Masson, ×200)

3.3 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠血清IL-1β、IL-6和TNF-α水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清IL-1β、IL-6和TNF-α水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,尿毒清颗粒组和大黄-丹参药对高、低剂量组大鼠血清IL-1β、IL-6和TNF-α水平显著降低($P < 0.01$),见表4。

3.4 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠结肠黏液层和杯状细胞的影响

与假手术组相比,模型组大鼠结肠黏液屏障被破坏,黏液层变薄,杯状细胞减少;与模型组相比,尿毒清颗粒和大黄-丹参药对高、低剂量均能不同程度地改善模型大鼠的结肠黏液屏障,黏液层较厚,杯状细胞较多。见图3。

表3 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠肾纤维化评分的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 3 Effect of RS on renal fibrosis score in CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	纤维化评分
假手术	—	0.0±0.0
模型	—	2.9±0.3**
尿毒清颗粒	2.5	1.5±0.5 ^{##}
大黄-丹参药对	6.0	1.6±0.7 ^{##}
	3.0	1.9±0.5 ^{##}

与假手术比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。^{##} $P<0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

3.5 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠结肠组织Muc2蛋白阳性表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠结肠组织Muc2蛋白阳性表达水平明显降低($P<0.01$);与模型组相

比,尿毒清颗粒和大黄-丹参药对高、低剂量组大鼠结肠组织Muc2蛋白阳性表达水平明显上调($P<0.01$)。见图4和表5。

3.6 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠结肠组织Muc2 mRNA表达的影响

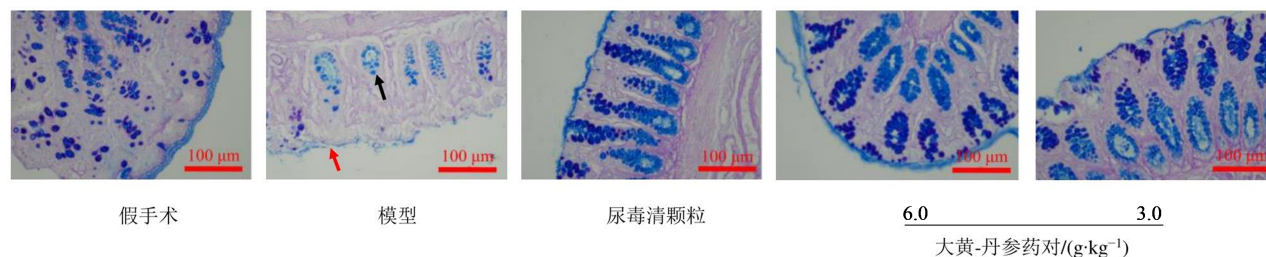
与假手术组相比,模型组大鼠结肠组织Muc2 mRNA相对表达量明显降低($P<0.01$);与模型组相比,尿毒清颗粒组和大黄-丹参药对高、低剂量组大鼠结肠组织Muc2 mRNA相对表达量显著上调($P<0.01$),见表6。

3.7 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠结肠组织Muc2蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠结肠组织Muc2蛋白相对表达量明显降低($P<0.01$);与模型组相比,尿毒清颗粒和大黄-丹参药对高、低剂量组大鼠结肠组织Muc2蛋白相对表达显著上调($P<0.01$),见图5和表7。

表4 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 4 Effect of RS on the serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	2.7±1.1	4.8±1.8	10.0±2.0
模型	—	18.2±3.2**	22.6±1.6**	29.8±2.3**
尿毒清颗粒	2.5	7.4±2.0 ^{##}	9.4±2.4 ^{##}	15.4±1.6 ^{##}
大黄-丹参药对	6.0	7.5±2.0 ^{##}	10.6±1.9 ^{##}	15.9±1.9 ^{##}
	3.0	10.0±2.3 ^{##}	15.0±2.2 ^{##}	21.0±1.9 ^{##}

与假手术比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。^{##} $P<0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

黑色箭头-杯状细胞减少;红色箭头-黏液层变薄。

Black arrow-Goblet cells were reduced; Red arrow-mucus layer was thinned.

图3 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠结肠组织黏液层和杯状细胞的影响(AB-PAS, ×200)

Fig. 3 Effect of RS on mucus layer and goblet cells of colonic tissue in CRF rats (AB-PAS, ×200)

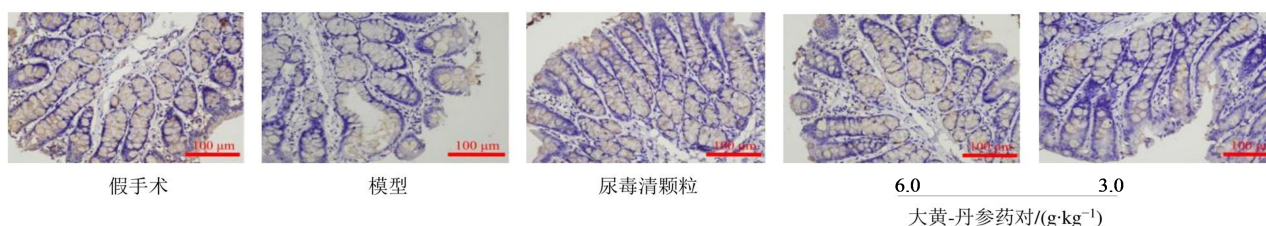


图4 大黄-丹参药对对CRF模型大鼠结肠组织Muc2蛋白阳性表达水平的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of RS on positive expression of Muc2 of colonic tissue in CRF rats (Immunohistochemistry, ×200)

表 5 大黄-丹参药对对 CRF 模型大鼠结肠组织 Muc2 蛋白阳性表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of RS on positive expression of Muc2 of colonic tissue in CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	吸光度
假手术	—	228.7±8.5
模型	—	59.1±13.8**
尿毒清颗粒	2.5	190.4±7.5 ^{##}
大黄-丹参药对	6.0	174.5±10.9 ^{##}
	3.0	106.6±9.6 ^{##}

与假手术比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

表 6 大黄-丹参药对对 CRF 模型大鼠结肠组织 Muc2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of RS on the expression of Muc2 mRNA of colonic tissue in CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Muc2 mRNA 表达量
假手术	—	1.00±0.00
模型	—	0.28±0.04**
尿毒清颗粒	2.5	0.94±0.04 ^{##}
大黄-丹参药对	6.0	0.93±0.12 ^{##}
	3.0	0.61±0.20 ^{##}

与假手术比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

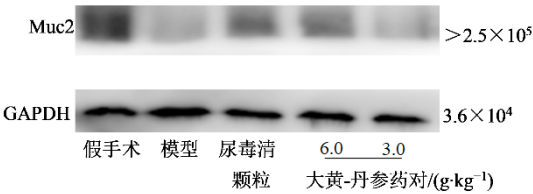


图 5 大黄-丹参药对对 CRF 模型大鼠结肠组织 Muc2 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of RS on expression of Muc2 protein of colonic tissue in CRF rats

表 7 大黄-丹参药对对 CRF 模型大鼠结肠组织 Muc2 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 7 Effect of RS on expression of Muc2 protein of colonic tissue in CRF rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Muc2/GAPDH
假手术	—	0.970±0.012
模型	—	0.270±0.006**
尿毒清颗粒	2.5	0.604±0.008 ^{##}
大黄-丹参药对	6.0	0.603±0.017 ^{##}
	3.0	0.386±0.006 ^{##}

与假手术比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

3 讨论

CRF 归属于祖国医学中“水肿”“肾劳”“溺毒”等范畴。中医认为脾肾亏虚,浊毒内蕴为其基本病机。“浊毒”既是病理产物,又是致病因素,贯穿于疾病的始终。“浊毒”日久不解,加之脾肾正气亏虚,进一步可凝痰聚淤,痰淤结聚肾络,则可致肾病恶化进展,更难治疗^[8]。根据《黄帝内经》中“开鬼门,洁净府,去菀陈莖”的理论,采用化瘀泄浊法以肠治肾,使内蕴之“浊毒”从肠道经粪便排出,减少 Scr、BUN、肠源性尿素素及炎症因子在血中蓄积,延缓 CRF 的进展^[9]。大黄为通腑泄浊代表药,有推陈致新、清泄浊毒的功效^[10-11];丹参为活血化瘀类药物,有去瘀生新、通行血脉之效^[12-13]。二者共奏化瘀泄浊之功,为临床治疗 CRF 的高频药对^[5]。大黄及其主要成分大黄素、大黄酸^[14]、大黄酚^[15]和芦荟大黄素^[16]均有抑制肾纤维化的报道,具有良好的肾脏保护作用。在 1 项 2 264 名参与者的荟萃分析中,丹参或其提取物如丹参酸和丹参酮作为常规药物的补充治疗,具有改善肾功能和延缓肾纤维化进展的潜在作用,且没有明显的不良反应^[17]。本实验结果表明,模型组大鼠血清 Scr 和 BUN 水平明显升高,肾组织受损,肾纤维化评分显著上调,提示 CRF 大鼠模型复制成功。给予大黄-丹参药对治疗后,大鼠血清 Scr 和 BUN 水平明显下调,肾组织纤维化评分显著降低,提示大黄-丹参药对能够保护 CRF 模型大鼠残存的肾功能,延缓肾纤维化的进展。

2011 年 Meijers^[18]首次提出了“肠-肾轴”学说,阐述了肠、肾之间在生理和病理上的密切关系,为 CRF 的防治开辟了新方向。肠黏液屏障,作为肠道的第一线防御机制,润滑并保护肠上皮细胞免受外界物质的侵害^[19]。结肠黏液层分为 2 层:外层疏松,是共生细菌的栖息地;内层致密,几乎没有任何细菌。杯状细胞分泌的黏液不断补充黏液层,其中, Muc2 是结肠杯状细胞合成和分泌的最丰富的分泌型黏蛋白,通过-COOH 末端和-NH₂ 末端聚合,建立起巨大的网状结构,构成结肠的内黏液层^[20]。CRF 患者因肾功能减退,尿毒素蓄积,导致其肠道菌群紊乱,有益菌减少,致病菌增多^[21]。一旦细菌从破坏的黏液外层迁移到内层,杯状细胞尤其是位于结肠隐窝处的杯状细胞就会启动一种级联反应,导致黏液增多,将细菌冲洗走。当杯状细胞清除细菌时,它会将自己弹出去。如果杯状细胞这种“自杀”式的行为不能阻止细菌攻击,那么就没有新的杯状细胞派送过来,这时结肠隐窝对细菌入侵是开放

的,进而潜在地破坏肠上皮屏障,导致炎症的发生^[22]。本实验结果表明,模型组大鼠结肠黏液层变薄,杯状细胞减少;结肠组织Muc2阳性表达显著减少,结肠组织Muc2 mRNA及蛋白表达水平明显下降;血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量显著升高。上述结果提示CRF模型大鼠结肠黏液屏障被破坏,机体处于炎症状态。给予大黄-丹参药对治疗后,大鼠结肠黏液层增厚,杯状细胞增多,结肠组织Muc2阳性表达显著增多,结肠组织Muc2 mRNA及蛋白表达水平明显升高,炎症因子水平显著降低,提示大黄-丹参药对能够恢复结肠黏液屏障功能,改善机体炎症状态。

大黄-丹参药对能够保护CRF模型大鼠的残存肾功能,改善肾纤维化程度,延缓CRF的进展;其作用机制可能与改善结肠黏液屏障功能,降低大鼠机体炎症状态有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Martínez-Hernández S L, Muñoz-Ortega M H, Ávila-Blanco M E, et al. Novel approaches in chronic renal failure without renal replacement therapy: A review [J]. Biomedicines, 2023, 11(10): 2828.
- [2] Bartochowski P, Gayraud N, Bornes S, et al. Gut-kidney axis investigations in animal models of chronic kidney disease [J]. Toxins, 2022, 14(9): 626.
- [3] Stolfi C, Pacifico T, Monteleone G, et al. Impact of western diet and ultra-processed food on the intestinal mucus barrier [J]. Biomedicines, 2023, 11(7): 2015.
- [4] Luis A S, Hansson G C. Intestinal mucus and their glycans: A habitat for thriving microbiota [J]. Cell Host Microbe, 2023, 31(7): 1087-1100.
- [5] 黄允瑜, 巴燕, 郑光, 等. 基于文本挖掘技术的慢性肾脏疾病中医治疗用药规律研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(8): 912-914.
Huang Y Y, Ba Y, Zheng G, et al. Study on the law of TCM treatment of chronic kidney disease based on text mining technology [J]. J Basic Chin Med, 2011, 17(8): 912-914.
- [6] 王宏, 徐娟, 江茜, 等. 大黄-丹参药对对慢性肾衰竭模型大鼠肠源性尿毒素含量和肠道屏障功能的影响 [J]. 中国药房, 2021, 32(7): 825-831.
Wang H, Xu J, Jiang Q, et al. Effects of couplet medicine of *Rheum palmatum*-*Salvia miltiorrhiza* on enterogenous urotoxins contents and intestinal barrier function in rats with chronic renal failure [J]. China Pharm, 2021, 32(7): 825-831.
- [7] 毕慧欣, 刘瑞洪, 刘虹, 等. 热休克蛋白47在单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质中的表达变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(20): 32-38.
Bi H X, Liu R H, Liu H, et al. Expression of HSP47 in kidneys of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. China J Mod Med, 2015, 25(20): 32-38.
- [8] 李子涵, 张琪琪, 马晨稀, 等. 慢性肾衰竭通腑泄浊法衍义 [J]. 世界中医药, 2023, 18(6): 817-822, 827.
Li Z H, Zhang Q Q, Ma C X, et al. Dredging fu-organs and descending the turbid for chronic renal failure [J]. World Chin Med, 2023, 18(6): 817-822, 827.
- [9] 吴正飞, 谢丽萍, 黄盼黎, 等. 基于肠道菌群探讨中医药治疗慢性肾衰竭的研究进展 [J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(8): 1531-1535.
Wu Z F, Xie L P, Huang P L, et al. Research progress on Chinese medicine in treating chronic renal failure based on intestinal flora [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2023, 43(8): 1531-1535.
- [10] 何剑川, 付饶, 邹小康, 等. 基于网络药理学研究扶正化瘀降浊通络方治疗慢性肾衰竭的作用机制 [J]. 河南中医, 2023, 43(8): 1175-1183.
He J C, Fu R, Zou X K, et al. Study on the mechanism of formula for reinforcing healthy qi and resolving stasis and suppressing turbidity and dredging collaterals in treating chronic renal failure based on network pharmacology [J]. Henan Tradit Chin Med, 2023, 43(8): 1175-1183.
- [11] 杨天文, 周纪军, 廖玉, 等. 大黄防治肝病的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7536-7544.
Yang T w, Zhou J j, Liao Y, et al. Research progress on *Rhei Radix et Rhizoma* in prevention and treatment of liver diseases [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(22): 7536-7544.
- [12] 丁昕瑶, 包永睿, 王帅, 等. 基于“质-量”双标的丹参质量分析方法研究 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7287-7292.
Ding X Y, Bao Y R, Wang S, et al. Study on quality analysis method of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* based on "quality-quantity" double standard [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(22): 7287-7292.
- [13] 王钰莹, 王川, 胡锐, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨丹参-川芎药对治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(4): 67-73.
Wang Y Y, Wang C, Hu R, et al. Mechanism of Danshen (丹参)-Chuanxiong(川芎) medicinal pair in the treatment of atherosclerosis based on network pharmacology and *in vitro* experiment [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(4): 67-73.
- [14] Wang Y Y, Yu F W, Li A, et al. The progress and prospect of natural components in rhubarb (*Rheum ribes* L.) in the

- treatment of renal fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 919967.
- [15] Gu M J, Zhou Y F, Liao N K, et al. Chrysophanol, a main anthraquinone from *Rheum palmatum* L. (rhubarb), protects against renal fibrosis by suppressing NKG2/NF- κ B pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 105: 154381.
- [16] Dou F, Liu Y T, Liu L M, et al. *Aloe-emodin* ameliorates renal fibrosis via inhibiting PI3K/akt/mTOR signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Rejuvenation Res, 2019, 22(3): 218-229.
- [17] Zhang W, Li J, Yang P, et al. Efficacy and safety of *Salvia miltiorrhiza* for treating chronic kidney diseases: A systematic review and Meta-analysis [J]. 2022, Doi: 10.1155/2022/2117433.
- [18] Meijers B K I, Evenepoel P. The gut-kidney axis: Indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(3): 759-761.
- [19] Gustafsson J K, Johansson M E V. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(12): 785-803.
- [20] Cai R, Cheng C, Chen J W, et al. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the mucus layer in the colon [J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 680-690.
- [21] Krukowski H, Valkenburg S, Madella A M, et al. Gut microbiome studies in CKD: Opportunities, pitfalls and therapeutic potential [J]. 2023, 19(2):87-101.
- [22] Birchenough G M, Nyström E E, Johansson M E, et al. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion [J]. Science, 2016, 352 (6293): 1535-1542.

[责任编辑 兰新新]