

的限速酶,且 HSL 过表达抑制了甘油三酯在脂肪细胞中的堆积。本研究发现,决明子提取物能上调脂肪组织 HSL 和 TGH 的转录表达,1 h 达到显著水平 ($P < 0.01$),这一结果与人类及啮齿类动物肥胖个体中 HSL 表达量下降的结论相一致^[10],说明 TGH 与 HSL 相同,其表达量高低与个体肥胖程度存在着相关性。用决明子提取物处理后的肌肉组织, TGH 和 HSL 的表达量总体呈下降趋势,且 HSL 的趋势更显著,这与先前的研究相一致^[11], HSL 基因 mRNA 的表达量与哈萨克羊肌内脂肪量呈负相关,同样说明决明子提取物处理高血脂模型小鼠能增加其肌肉脂肪的量。

本实验主要针对决明子提取物对高血脂小鼠的血脂和聚脂基因的影响展开的研究,结果证实决明子提取物在调血脂和调节聚脂基因表达上的确发挥着重要的作用。然而决明子提取物本身富含多种有效成分,是功能多样的一种中药,其作用机制、作用途径也并非单一,这就造成了决明子研究的复杂性,因此对其调脂有效成分的研究有待进一步深入。

参考文献:

- [1] Jia Z B, Tao F, Guo L, et al. Antioxidant properties of extracts from Juemingzi (Cassia tora L.) evaluated in vitro [J] Lebensm Wiss Technol, 2007, 40: 107221077
- [2] Bozoky Z, Balogh L, Mathe D, et al. Evaluation of rat and rabbit sera lipoproteins in experimentally induced hyperlipid

- demia by analytical ultracentrifugation [J] Eur Biophys J, 2006, 3(35): 202213
- [3] Patil U K, Saraf S, Dixit V K. Hypolipidemic activity of seeds of Cassia tora Linn [J] J Ethnopharmacol, 2004, (90): 2492252
- [4] Willens H J, Byers P M, Sornaraj A A, et al. Pericardial fat predicts diabetes mellitus in patients with severe obesity [J] Surg Obes Relat Dis, 2007, 3(3): 340
- [5] Kohjima M, Higuchi N, Kato M, et al. SREBP2 1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease [J] Int J Mol Med, 2008, 21(4): 5072511
- [6] Raghoebar R, Yellaturu C, Deng X, et al. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis [J] Trends Endocrinol Metab, 2008, 19(2): 6273
- [7] Huang C, Zhang Y B, Gong Z W, et al. Berberine inhibits 3T3L1 adipocyte differentiation through the PPARC pathway [J] Biochem Biophys Res, 2006, 348(2): 5712578
- [8] Pang J S, Choi Y S, Park T S. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue [J] Arch Biochem Biophys, 2008, 476(2): 1782185
- [9] Matsubara Y, Sato K, Ishii H, et al. Changes in mRNA expression of regulatory factors involved in adipocyte differentiation during fatty acid induced adipogenesis in chicken [J] Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol, 2005, 141(1): 102115
- [10] Bullo M, Salas Salvado J, Garcia Lorda P. Adiponectin expression and adipose tissue lipolytic activity in lean and obese women [J] Obes Surg, 2005, 15(3): 382386
- [11] Qiao Y, Huang Z G, Li Q F, et al. Developmental changes of the FAS and HSL mRNA expression and their effects on the content of intramuscular fat in Kazak and Xinjiang sheep [J] J Genet Genom, 2007, 34(10): 902917

肾康注射液对慢性马兜铃酸肾病模型大鼠肾间质纤维化的拮抗作用

乔颖进^{1,2}, 谌贻璞^{1*}, 芮宏亮¹, 董鸿瑞¹, 刘章琰²

(11 卫生部中日友好医院 肾病中心, 北京 100029; 2 郑州大学第一附属医院 肾病风湿科, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 研究肾康注射液对慢性马兜铃酸肾病 (CAAN) 模型大鼠肾间质纤维化的拮抗效应。方法 雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和干预组, 每组 6 只。于 0、1、4、8、12 周末分别检测体质量、尿糖、24 h 尿蛋白定量和肌酐清除率 (Ccr); 第 12 周末处死大鼠留取肾组织, 行 Masson 染色观察肾间质纤维化程度; 并用逆转录实时定量聚合酶链反应和免疫组织化学方法检测肾组织中转化生长因子 2 β_1 (TGF2 β_1)、结缔组织生长因子 (CTGF)、纤溶酶原激活物抑制物 21 (PAI21)、金属蛋白酶组织抑制物 21 (TIMP21) 和 N 型胶原 (Col I) mRNA 及蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组和干预组大鼠体质量明显减轻 ($P < 0.01$), 但干预组大鼠体质量明显高于模型组, 12 周末时存在显著差异 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量显著上升 ($P < 0.01$), Ccr 显著下降 ($P < 0.01$); 12 周时肾间质纤维化面积显著增加 ($P < 0.01$); 肾组织内上述各检测指标的 mRNA 及蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 干预组大鼠各时间点 Ccr 均显著升高 ($P < 0.01$); 第 12 周时 24 h 尿蛋白定量及肾间质纤维化面积均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 上述高表达的 mRNA 及蛋白指标均被显著抑制 ($P < 0.05$)。结论 肾康注射液可能通过抑制肾组织促细胞外基质 (ECM) 合成因子 (TGF2 β_1 、CTGF) 及抗 ECM 降解因子 (TIMP21、PAI21) 生成, 而改善 CAAN 的肾间质纤维化及肾功能。

* 收稿日期: 200807209

基金项目: 卫生部属 (管) 医疗机构临床学科重点项目

作者简介: 乔颖进 (1982), 女, 河南洛阳人, 肾病专业硕士生, 研究方向为慢性肾衰竭的防治。

Tel: (0371) 66862202 E-mail: abbie0616@sina.com

* 通讯作者 谌贻璞 Tel: (010) 84206174 E-mail: Chen_yipu@medmail.com.cn

关键词: 肾康注射液; 马兜铃酸; 肾间质纤维化; 转化生长因子 $2B_1$

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)04-0582-06

Antagonizing effects of Shenkang Injection on renal interstitial fibrosis in model rat of chronic aristolochic acid nephropathy

QIAO Ying²jin^{1, 2}, CHEN Y²pu¹, RUI Hong²liang¹, DONG Hong²rui¹, LIU Zhang²suo²

(1 Centre of Nephrology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. Department of Nephrology and Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To study the antagonizing effects of Shenkang Injection (SKI) on renal interstitial fibrosis in model rats with chronic aristolochic acid nephropathy (CAAN). Methods Eighteen male SD rats were equally divided into the following three groups: control group, model group, and intervention group. Body weight, urinary glucose, 24 h urinary protein excretion, and creatinine clearance (Ccr) were measured at the end of 0, 1, 4, 8, and 12 week, respectively. At the end of the 12 week, all the rats were sacrificed and the renal pathological examination of each rat was performed. The mRNA and protein expression of transforming growth factor $2B_1$ (TGF $2B_1$), connective tissue growth factor (CTGF), plasminogen activator inhibitor 21 (PAI 21), tissue inhibitor of metalloproteinase 21 (TIMP 21), and type I collagen (Col I) in kidney tissue were determined by real-time (RT)-PCR and immunohistochemistry staining, respectively. Results Compared with control group, body weight of rats in intervention group and intervention group were significantly decreased ($P < 0.01$); body weight of rats in intervention group was higher than that in intervention group, with a significant difference at the end of 12 week ($P < 0.05$). Compared with control group, the 24 h urinary protein excretion of rats in model group and intervention group increased significantly ($P < 0.01$); but the 24 h urinary protein excretion of rats in intervention group was lower than that in model group ($P < 0.05$). Compared with control group, the Ccr of model rats decreased significantly ($P < 0.01$); the Ccr of rats in intervention group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$). Compared with control group, the relative area of interstitial fibrosis of kidney tissue, in model rats was significantly enlarged ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression of TGF $2B_1$, CTGF, PAI 21 , TIMP 21 , Col I in kidney tissue was significantly up-regulated ($P < 0.01$) in the model rats. Compared with the control group. The increased mRNA and protein expression of TGF $2B_1$, CTGF, PAI 21 , TIMP 21 , Col I were all significantly down-regulated in intervention group ($P < 0.05$). Conclusion SKI could inhibit the production of promoting extracellular matrix (ECM) synthesis factors (TGF $2B_1$ and CTGF) and antagonizing ECM degradation factors (TIMP 21 and PAI 21) in kidney tissue, which might be the mechanism that SKI alleviates the renal interstitial fibrosis and improves the renal function in CAAN rats.

Key words: Shenkang Injection; aristolochic acid; renal interstitial fibrosis.; transforming growth factor $2B_1$ (TGF $2B_1$)

近年来,服用含马兜铃酸(aristolochic acid, AA)中药引起的慢性马兜铃酸肾病(chronic aristolochic acid nephropathy, CAAN)已日益受到重视。该病临床以慢性进行性肾衰竭、病理以寡细胞性肾间质纤维化为主要特点,至今尚无成熟治疗方案^[1]。本课题组通过细胞生物学实验证实,由丹参、红花、大黄、黄芪组成肾康注射液能拮抗AA引起的人近端肾小管上皮细胞的促纤维化效应^[2]。本研究在上述工作基础上,进一步采用肾康注射液对本课题组建立的CAAN模型大鼠^[3]进行治疗,观察疗效并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物:18只雄性SD大鼠,8周龄,体质量

200 g左右,为SPF级动物,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 药品:关木通浸膏水溶液制备方法同文献方法^[3],经高效液相色谱法检测关木通浸膏中含马兜铃酸 61.7 mg/g 。肾康注射液由丹参、红花、大黄、黄芪组成,由西安嘉惠药业有限公司提供,批号200611013,规格 20 mL/支 ,含生药 0.3 g/mL 。

1.3 主要试剂:总RNA提取试剂盒(上海生工公司);莫洛尼鼠白血病病毒(M2MLV)反转录酶、Taq DNA聚合酶、RNA酶抑制剂(华美生物工程有限公司);实时定量聚合酶链反应母液(东洋纺生物科技公司);PCR引物(上海生工公司,见表1)。免疫组织化学染色试剂:EnVisionTM加强型试剂盒

(DAKO, 丹麦), SP9003 试剂盒 (北京中杉金桥公司, 供 SLAB 染色用)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of PCR Primer

引物名称	引物序列	产物长度/bp
Col I	正向 5'CTCAGGGGCGAAGGCCAACA GT23'	125
	反向 5'ATGGGCAGGCGGGAGGTC T23'	
TGF2B1	正向 5'2CGGCAGCTGTACA TTGACTT23'	154
	反向 5'2TGTGTTGGTTGTA GAGGGCAA23'	
CTGF	正向 5'2ATCCCTGCGACCCACA CAAG23'	145
	反向 5'2CAACTGCTTTGGAAGGACTGCG23'	
TIMP21	正向 5'2GACCTGGTTATAA GGGCTAAA23'	216
	反向 5'2GCCCGT GATGA GAAACTCTTCACT23'	
PA21	正向 5'2ATGAGATCACTACTGCGGACGCCATCTTTG23'	343
	反向 5'2GCACGGA GATGGTGCTACCATCAGACTTG23'	
GAPDH	正向 5'2TGGGTGTGAA CCACGAGAA23'	145
	反向 5'2GGCAT GGA CTGTGGTCATGA23'	

11 4 实验分组和给药: 大鼠随机分为 3 组, 每组大鼠 6 只。对照组用实验动物饮用水每日清晨 ig, 生理盐水 11 67 mL/kg 每日下午 ip; 模型组造模方法同文献方法^[3]; 干预组在模型组基础上, 再予肾康注射液 11 67 mL/kg (相当于生药 5 g/kg) 每日下午 ip 给药, 共 12 周。

11 5 标本留取及生化指标测定: 全部大鼠于实验第 0、1、4、8、12 周末测量体质量、血肌酐 (Scr) 和尿肌酐 (Ucr) (苦味酸法, 日立 7170A 自动生化仪测定), 肌酐清除率 (Ccr) 采用 $Ccr = \frac{Ucr}{Lmol/L} \times \frac{24h}{mL/min} / Scr (Lmol/L)$ 计算。24 h 尿蛋白定量 (Bradford 法) 及尿糖定性 (试纸法)。第 12 周时处死大鼠留取肾组织标本^[3]。

11 6 肾组织病理检查: 肾脏标本常规脱水、包埋、切片及 Masson 染色后, 光学显微镜 (100 @) 采集皮质部分的肾间质图像 (每只大鼠随机采集 10 个视野, 避开肾小球及较大小动脉), 用 Motic Med 6. 0 数码医学图像分析系统 (北京麦克奥迪图像技术有限公司) 进行自动测量分析。

肾间质纤维化相对面积= 肾间质绿染面积/视野总面积 @100%

11 7 逆转录及实时定量 PCR 测定: 总 RNA 提取

及逆转录反应同文献方法^[3]。以逆转录所获 cDNA 为模板, SYBR Green I 为荧光标记物, 行相对定量实时 PCR 测定 (美国 ABI 7500 实时 PCR 仪), 操作方法同文献方法^[3]。以 32 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参照, 检测转化生长因子 2B (TGF2 B1)、结缔组织生长因子 (CTGF)、纤溶酶原激活物抑制物 21 (PA21)、金属蛋白酶组织抑制物 21 (TIMP21) 和 N 型胶原 (Col I) 的表达。扩增后目的基因相对表达量 = $2^{- (C_{\text{Cytokine}} - C_{\text{GAPDH}})}$ @10³, 公式内 Cytokine 系指 TGF2B1、CTGF、PA21、TIMP21、Col I 等目的基因, 循环阈值 Ct (cycle threshold) 为目的基因 cDNA 达到指数扩增时的循环数。

11 8 免疫组织化学染色: 肾组织切片常规处理后, 微波处理 98 e、10 min (TGF2B1、CTGF、PA21、TIMP21) 或 01 4% 胃蛋白酶消化 37 e、2 h (Col I) 修复抗原, EnVision™ 二步法染色按说明书操作, SLAB 染色操作方法同文献方法^[3]。对染色片进行图像采集 (200 @) 及测量分析 (方法同 Mas2 son 染色)。

肾小管间质相对阳性面积= 肾小管间质阳性面积/视野总面积 @100%

11 9 统计学处理: 全部计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较均采用单因素方差分析 (One way ANOVA), 各组间两两比较采用最小显著差 (LSD) 检验, 统计分析由 SPSS 151 0 软件完成。

2 结果

21 1 体质量变化: 给药后各时间点模型组及干预组大鼠体质量均显著降低, 与对照组相比有统计学意义 (P< 01 01), 而干预组大鼠体质量高于模型组, 第 12 周时差异有统计学意义 (P< 01 05), 见表 2。

21 2 尿蛋白定量: 给药后各时间点模型组及干预组大鼠尿蛋白定量均显著升高, 与对照组相比有统计学意义 (P< 01 01), 而干预组大鼠尿蛋白定量低于模型组, 第 12 周时差异有统计学意义 (P< 01 05), 见表 3。

表 2 各组大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, n= 6)

Table 2 Changes of body weight of rats in groups ($\bar{x} \pm s$, n= 6)

组 别	体质量/g				
	0 周	1 周	4 周	8 周	12 周
对照	2211 6? 41 4	2811 9? 41 4	4081 8? 201 5	5181 9? 401 4	6021 9? 431 7
模型	2211 0? 71 3	2191 3? 151 2**	2741 9? 171 4**	2881 3? 251 8**	2471 1? 331 2**
干预	2211 7? 21 8	2211 6? 71 3**	2841 1? 31 7**	3131 3? 121 6**	3091 6? 331 9** #

与对照组比较: ** P< 01 01; 与模型组比较: # P< 01 05

** P< 01 01 vs control group; # P< 01 05 vs model group

21 3 尿糖定性: 各组大鼠尿糖定性均始为阴性。

21 4 各组 Ccr 变化: 给药后各时间点模型组和干
预组大鼠 Ccr 值均显著降低, 与对照组相比有统计
学意义 ($P < 0.01$); 干预组大鼠 Ccr 值高于模型
组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 4。

21 5 肾组织病理检查: 12 周时模型组大鼠肾间质

表 3 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Comparison of 24 h urinary protein excretion of rats in groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	24 h 尿蛋白/mg				
	0 周	1 周	4 周	8 周	12 周
对照	51.39 $\pm$ 01.53	101.89 $\pm$ 01.75	121.10 $\pm$ 01.79	111.24 $\pm$ 01.89	111.59 $\pm$ 01.10
模型	51.33 $\pm$ 01.50	281.87 $\pm$ 51.23**	291.37 $\pm$ 71.24**	341.58 $\pm$ 111.68**	461.54 $\pm$ 121.24**
干预	51.35 $\pm$ 01.20	281.69 $\pm$ 81.70**	271.97 $\pm$ 81.15**	341.36 $\pm$ 81.09**	331.30 $\pm$ 11.44***

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

表 4 各组大鼠 Ccr 值变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Ccr Changes value of rats in groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	Ccr 值/(mL# min ⁻¹)				
	0 周	1 周	4 周	8 周	12 周
对照	11.08 $\pm$ 01.15	11.17 $\pm$ 01.12	11.17 $\pm$ 01.11	11.18 $\pm$ 01.13	11.07 $\pm$ 01.14
模型	11.08 $\pm$ 01.12	01.64 $\pm$ 01.19**	01.75 $\pm$ 01.11**	01.55 $\pm$ 01.16**	01.37 $\pm$ 01.16**
干预	11.08 $\pm$ 01.10	01.90 $\pm$ 01.10***	01.89 $\pm$ 01.09***	01.83 $\pm$ 01.19***	01.62 $\pm$ 01.09***

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

纤维化相对面积[(141.97 $\pm$ 01.85)%] 及干预组肾间质纤维化相对面积[(61.99 $\pm$ 01.89)%] 均高于对照组[(01.48 $\pm$ 01.09)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而干预组大鼠肾间质纤维化相对面积低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

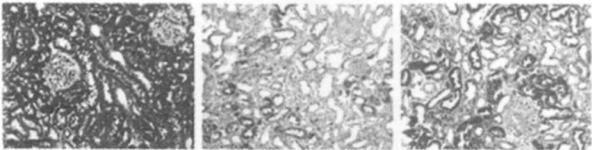


图 1 大鼠肾组织间质纤维化表现 (Masson 染色)

Fig. 1 Interstitial fibrosis of kidney in rats (Masson staining)

21 6 肾组织各因子的 mRNA 表达: 12 周时模型组及干预组 TGF2B₁、CTGF、PAI21、TIMP21 及 Col I 的 mRNA 表达均显著升高, 模型组各指标分别上调了 31.81、11.46、31.79、81.15、61.52 倍, 与对照组相

比有差异显著 ($P < 0.01$)。干预后上调的指标均显著下降, 抑制率分别为 46%、12%、37%、22%、28%, 与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$), 见表 5。

21 7 肾组织各因子的蛋白质表达: 对照组大鼠肾组织中 TGF2B 及 CTGF 主要表达于部分肾小管及肾小球, 血管壁仅微弱表达, 肾间质未见着色; PAI21 主要表达在血管壁和部分肾小管, 肾小球及肾间质未见着色; TIMP21 主要表达在部分肾小管, 肾小球仅微弱表达, 肾血管及肾间质未见着色; Col I 仅表达于肾间质及血管壁外膜, 肾小球及肾小管未见着色。12 周时模型组与干预组肾小管上 TGF2B、CTGF、PAI21、TIMP21 表达及肾间质中 Col I 表达均显著上调, 模型组上述指标分别升高了 21.88、31.25、21.63、21.70、71.84 倍, 与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.01$)。干预组上述上调的指标均显著下降, 抑制率分别为 31%、23%、34%、36%、60%, 与模型组相比有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 6。

表 5 大鼠肾组织各因子的 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 mRNA Expression of all factors in kidney tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	mRNA 相对表达量				
	TGF2B ₁	CTGF	PAI21	TIMP21	Col I
对照	71.41 $\pm$ 11.28	311.84 $\pm$ 61.39	01.87 $\pm$ 01.35	01.34 $\pm$ 01.04	111.20 $\pm$ 21.20
模型	281.22 $\pm$ 81.70**	461.40 $\pm$ 31.65**	31.30 $\pm$ 11.52**	21.77 $\pm$ 01.53**	731.01 $\pm$ 171.95**
干预	151.15 $\pm$ 11.79***	401.80 $\pm$ 21.00***	21.07 $\pm$ 01.67***	21.17 $\pm$ 01.29#	521.63 $\pm$ 121.60***

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

表 6 大鼠肾组织各因子的蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Protein expression of all factors in kidney tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	蛋白相对表达量				
	TGF2B ₁	CTGF	PAI21	TIMP21	Col I
对照	21 17? 11 75	31 35? 11 23	11 33? 11 46	11 74? 11 58	11 93? 11 45
模型	61 26? 11 73* *	111 29? 11 15* *	31 50? 11 35* *	41 69? 11 90* *	151 14? 21 88* *
干预	41 31? 11 21* * #	71 88? 11 06* * #	21 32? 11 33* * #	31 00? 11 42* * #	91 11? 11 70* * #

与对照组比较: * * P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05
* * P < 0.01 vs control group; # P < 0.05 vs model group

3 讨论

含马兜铃酸 (AA) 的药物可导致肾损害, 其中 CAAN 的主要病理表现为寡细胞性肾间质纤维化^[1]。肾间质纤维化的发生、发展与肾间质细胞外基质 (ECM) 合成与降解失衡相关^[4]。TGF2B₁ 及 CTGF 在调控 ECM 合成方面发挥重要作用。TGF2B₁ 是公认的最重要的致纤维化因子, 它具有促进成纤维细胞的活化和肾小管上皮细胞的转分化, 促进 ECM 合成的作用^[5]。CTGF 是 TGF2B₁ 的下游因子, 在 TGF2B₁ 诱导下由成纤维细胞等细胞生成, 从而介导 TGF2B₁ 的促 ECM 合成效应^[4, 6]。在调控 ECM 降解方面, 纤溶酶、基质金属蛋白酶 (MMP)、PAI21 和 TIMP21 发挥着重要作用, 纤溶酶能直接降解 ECM 并激活 MMP 从而促进 ECM 降解; 而 PAI21 则阻止纤溶酶原激活生成纤溶酶, 同时 TIMP21 能抑制 MMP 活性, 从而发挥抑制 ECM 降解效应^[4, 6]。另外, TGF2B₁ 也具有增加 TIMP21 活性及抑制 MMP 合成作用, 抑制 ECM 降解^[4, 6]。前期体外细胞共培养研究已证实, AA 刺激 HKC 活化后分泌的 TGF2B₁, 能直接作用于肾间质成纤维细胞促其合成 Col I^[7]。所以, AA 刺激肾小管上皮细胞分泌的上述促 ECM 合成因子 (TGF2B₁、CTGF) 及抗 ECM 降解因子 (PAI21、TIMP21), 在体内很可能通过旁分泌途径作用于肾间质成纤维细胞, 增加其 ECM 合成, 并抑制 ECM 降解, 从而导致肾间质纤维化。本实验中, 12 周时模型组大鼠肾脏 TGF2B₁、CTGF、PAI21、TIMP21 和 Col I 的 mRNA 和蛋白相对表达量较对照组均显著上调, 这很可能是导致 CAAN 肾间质纤维化的重要机制。

CAAN 进展较快, 危害甚大, 常导致不可逆性终末肾衰竭, 目前该病尚无有效治疗方法。中国医药在抗纤维化治疗上具有广阔前途。肾康注射液是以化瘀泄浊、扶正固本为组方原则, 由大黄、丹参、黄芪、红花组成的复方中药注射液。研究发现肾康注射液能明显抑制猪近端肾小管上皮细胞 LLC2PK1 合成细胞外基质成分纤连蛋白 (FN)、层连蛋白

(LN) 及 Col 0^[8~10]。在 5/6 肾切除大鼠模型, 肾康注射液可以显著降低大鼠的血压、24 h 尿蛋白定量、血尿素氮、血肌酐、胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白, 减轻大鼠的肾脏病理损害, 抑制肾组织 TGF2B₁ 的表达^[11]。另外, 肾康注射液还可以显著抑制肾小球系膜细胞分泌 FN、LN 及 Col 0, 并呈量效关系^[12]。在糖尿病肾病大鼠模型 (单肾切除加链脲佐菌素注射制作模型) 中, 腹腔注射肾康注射液, 能明显抑制大鼠肾小球 FN、LN 及 Col 0 的合成和分泌^[13]。

前期细胞生物学实验显示, 肾康注射液能显著抑制 AA 引起的人近端肾小管上皮细胞对 TGF2B₁、CTGF、TIMP21、PAI21 mRNA 及蛋白的高表达, 从而提示肾康注射液可能通过这一机制拮抗 AA 的促肾间质纤维化效应^[2]。在细胞实验基础上, 进行了整体水平研究, 以进一步验证上述假说。本实验结果显示肾康注射液确能显著下调 CAAN 模型大鼠肾组织 TGF2B₁、CTGF、PAI21、TIMP21、Col I mRNA 和蛋白的高表达, 拮抗肾间质纤维化, 改善肾功能, 所以这一整体水平研究进一步验证了细胞水平研究结果。

综合已完成的体内、外实验研究, 可以提示肾康注射液很可能通过下调 TGF2B₁、CTGF 高表达而抑制 ECM 合成, 并下调 PAI21 和 TIMP21 高表达而促进 ECM 降解, 从而减轻肾间质 Col I 蓄积, 起到拮抗肾间质纤维化及改善肾功能的作用。

参考文献:

[1] 陈 文, 谌贻璞, 李 安, 等. 马兜铃酸肾病的临床与病理表现 [J]. 中华医学杂志, 2001, 81(18): 11021105
[2] 沈水娟, 谌贻璞, 杨 敏, 等. 肾康注射液拮抗马兜铃酸对人近端肾小管上皮细胞作用的研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(1): 102131
[3] 高艳丽, 谌贻璞, 董鸿瑞, 等. 慢性马兜铃酸肾病肾间质纤维化发病机制的初步探讨 [J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21(1): 312351
[4] Eikmans M, Baelde J J, de Heer E, et al. ECM homeostasis in renal diseases: a genomic approach [J]. J Pathol, 2003, 200: 5262536
[5] Liu YL Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and

- therapeutics [J] Kidney Int, 2006, 69(2): 212-217
- [6] Eddy A Al Progression in chronic kidney disease [J] Adv Chronic Kidney Dis, 2005, 12(4): 352-363
- [7] 方 静, 谌贻璞, 张 嫩¹ 通过共培养观察被马兜铃酸活化后的肾小管上皮细胞对成纤维细胞的作用 [J] 中华肾脏病杂志, 2004, 20(5): 322-324
- [8] 赵宗江, 张新雪, 傅 博, 等¹ 肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC) PK1 分泌纤维连接蛋白的影响 [J] 北京中医药大学学报, 2001, 24(1): 32-34
- [9] 赵宗江, 傅 博, 陈香美, 等¹ 肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC) PK1 分泌层黏连蛋白的影响 [J] 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(9): 502-507
- [10] 赵宗江, 张新雪, 傅 博, 等¹ 肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC) PK1 分泌 α_1 型胶原的影响 [J] 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(4): 200-202
- [11] 赵宗江, 张新雪, 师锁柱, 等¹ 肾康注射液延缓 5/6 肾切除大鼠慢性肾功能衰竭进展的机理探讨 [J] 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(10): 162-164
- [12] 刘玉宁, 王立红, 郭立中, 等¹ 肾康注射液对肾小球系膜基质作用的血清药理学研究 [J] 中国中医药科技, 2005, 12(4): 223-224
- [13] 王立红, 刘玉宁, 郭立中, 等¹ 肾康注射液对糖尿病肾病大鼠细胞外基质影响的实验研究 [J] 中国中医药科技, 2005, 12(2): 77-79

连翘苷 D 和凝血因子 Xa 相互作用的分子动力学模拟

金丽媛^{1,2}, 张士俊², 刘冰妮², 徐为人^{2*}, 刘 巍², 刘 鹏², 汤立达³

(1 天津医科大学基础医学院, 天津 300070; 2 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193;

3 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部级共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘 要:目的 阐明连翘苷 D (FTD) 与凝血因子 Xa (FXa) 活性位点的动态相互作用过程, 为设计新药提供参考依据。方法 利用 FXa 蛋白与其原始配体 (RPR) 的合理复合物结构作参照物, 通过对接获得了 FTD 与 FXa 的复合结构。采用分子动力学方法模拟了两个复合物在水溶液中 500 ps 运动轨迹, 考察配体与受体在动态相互作用过程中的变化过程。结果 RPR 依靠氢键作用与受体 S1 区域和中间部保持稳定的匹配状态, 以非极性的芳香基与 S4 区域 (Tyr99、Phe174、Trp215) 形成了很好的空间匹配。FTD 与受体相互作用方式不同, 与受体的 S1 区域作用较弱, 相对而言与 S4 区域及中间部的作用较强, 导致在相互作用的过程中被受体排斥出来。结论 通过配体与受体动态相互作用模拟研究表明, 作为 FXa 的抑制剂与受体 S1 区结合的部分结构应该相对刚性, 能与受体形成较强的氢键, 在 S4 区需要一定的疏水性和芳香性, 在中间部分需要一定量的氢键来帮助固定配体。

关键词:连翘苷 D; 凝血因子 Xa; 分子动力学; 动态相互作用

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)04-0592-05

Molecular dynamic simulation of interaction between coagulation forsythoside D and factor Xa

JIN Liyuan^{1,2}, ZHANG Shijun², LIU Bingni², XU Weiren²,

LIU Wei², LIU Peng², TANG Lida³

(1 College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;

3. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics,

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To illuminate the dynamic interactive mode between coagulation factor Xa (FXa) active site and forsythoside D (FTD), in order to supply some advices for the design of new drugs. Methods To make FXa protein receptor and its initial ligand (RPR) as a reasonable compound and obtain a compound structure of FTD and FXa by using molecular docking. In order to investigate the interaction of the ligand and receptor during the dynamic state, 500 ps molecular dynamics simulation was chosen to estimate their binding mode. Results RPR remained stable matching state with S1 domain and middle part of the receptor depending on hydrogen bond, formed fine spacial matching with S4 (Tyr99, Phe174, and Trp215) relying on nonpolarity aromatic groups. The interaction style of FTD and receptor is different from RPR, it had weak role with S1 domain but had relatively strong action with S4 and middle part, as a

* 收稿日期: 2008-07-22

基金项目: 科技部支撑项目 (2007BAI41B00); 天津市支撑项目 (07ZCKFSH00300)

作者简介: 金丽媛 (1982), 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事药理学研究。Tel: 13612062511 E-mail: jinliyuan2006@163.com

* 通讯作者: 徐为人 Tel: (022) 23003529 E-mail: xwrtj@yahoo.com.cn