

黄芪甲苷对肾纤维化小鼠 Toll/MyD88 依赖性通路的作用研究

杨茹茜, 徐倩, 杨旖, 金晶, 卢雨松, 罗韬, 赵春玲*

西南医科大学 基础医学院, 四川 泸州 646000

摘要: **目的** 观察黄芪甲苷(astragaloside IV)对单侧输尿管结扎(UUO)小鼠肾组织纤维化程度的影响,探讨其作用机制。**方法** 将雄性C57BL/6小鼠50只随机均分为假手术组,模型组,黄芪甲苷高、中、低剂量(50、30、10 mg/kg)组。除假手术组外,其余各组小鼠均行UUO术,从手术当天黄芪甲苷各组ig给药,连续14 d。检测血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平,HE和Masson染色下光镜观察肾组织病理和胶原的沉积;免疫组化和Western blotting方法从蛋白水平观察各组肾脏中Toll/MyD88依赖信号通路相关分子(TLR4、TLR2、MyD88、TRAF-6、NF- κ B、TNF- α 、IL-6)的表达。**结果** 模型组小鼠患侧肾脏的纤维化程度、病理损害最明显;Toll/MyD88依赖信号通路相关的分子的表达量最多。而随着黄芪甲苷组药物剂量的增加,小鼠肾脏损伤有明显改善,该信号通路相关因子(TLR4、TLR2、MyD88、TRAF-6、NF- κ B)蛋白表达水平也在相应减少,且对该信号通路末端炎症因子TNF- α 和IL-6的表达有抑制作用。**结论** 黄芪甲苷可能通过抑制Toll/MyD88依赖信号通路及炎症因子TNF- α 和IL-6的释放来改善小鼠UUO所致的肾纤维化。

关键词: 黄芪甲苷; 肾纤维化; Toll/MyD88 依赖信号通路; 单侧输尿管结扎; 免疫炎症反应

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3775-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.017

Effect of astragaloside IV based on Toll/MyD88 dependent signaling pathway in treatment of renal fibrosis mice

YANG Ru-qian, XU Qian, YANG Yi, JIN Jing, LU Yu-song, LUO Tao, ZHAO Chun-ling

Basic Medicine College, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To study the effect of astragaloside IV on renal fibrosis mice with unilateral ureteral obstruction (UUO) and discuss the mechanism. **Methods** Male C57BL/6 50 mice were divided into five groups randomly, such as Sham-operated group, model group and high-, medium-, and low-dose astragaloside IV groups. From the day of surgery, the mice in astragaloside IV groups (high-, medium- and low-dose) were treated by gavage of astragaloside IV for 2 weeks in doses of 50, 30, and 10 mg/(kg·d) separately. The mice in Sham-operated group and model group were treated with saline instead of astragaloside IV. Serum creatinine and blood urea nitrogen were detected by chemical methods. Histopathological changes and collagen deposition of affected kidney were observed under optical microscope with HE and MASSON staining. The expression levels of Toll/MyD88 dependent signaling pathway related molecules (TLR4, TLR2, MyD88, TRAF6, NF-Kappa B, TNF- α , and IL-6) in affected kidney were measured by immunohistochemistry and Western blotting methods and observed from protein levels in each group. **Results** The degree of fibrosis and histopathological damage of affected kidney of mice in model group is the most obvious. And the expression levels of Toll/MyD88 dependent signaling pathway related molecules in affected kidney of mice in model group were the highest. With drug concentration increased in groups of astragaloside IV, in these groups, the injury of affected kidney had been obviously reduced, and the protein expression levels of Toll/MyD88 dependent signaling pathway related molecules (TLR4, TLR2, MyD88, TRAF6, and NF-Kappa B) were also in corresponding reduced, at the same time the expression of terminal inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) has been suppressed. **Conclusion** Astragaloside IV may improve renal interstitial fibrosis in mice after UUO by inhibiting the expression of Toll/MyD88 dependent signaling pathway and release of inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6).

Key words: astragaloside IV; renal interstitial fibrosis; Toll/MyD88 dependent signaling pathway; unilateral ureteral ligation; immune and inflammatory responses

收稿日期: 2017-02-26

作者简介: 杨茹茜, 女, 硕士研究生。Tel: 18208315083 E-mail: 290057691@qq.com

*通信作者 赵春玲, 女, 生理学教授, 研究方向为肾功能保护。Tel: 18683073667 E-mail: zhchlzth@21cn.com

肾纤维化是几乎所有肾脏疾病进展到终末期肾功能衰竭的共同通路,比原发疾病更易导致肾功能的进行性恶化^[1]。肾纤维化是多因素驱动的病理过程,涉及炎症、氧化应激、多种细胞因子的作用及信号级联、细胞凋亡、成纤维细胞增殖和活化,以及上皮细胞向成纤维细胞转化等^[2]。抗肾纤维化的治疗一直以来都受到了广大医疗工作者们的重视。大量的临床和实验研究成果显示了中医药在抗肾纤维化方面的良好前景^[3-6]。大量的研究表明黄芪甲苷(astragaloside IV)有明显的抗肾纤维化的作用,在临床上也有较明显的效果^[7]。有研究初步证实,Toll样受体 4(TLR4)介导的免疫炎症反应参与了肾间质纤维化的过程,且其表达量随肾间质纤维化程度的加重而升高^[8]。也有研究者表明在 Toll 样受体(TLRs)缺陷小鼠中低表达的巨噬细胞、树突状细胞和成纤维细胞的激活减少抑制了纤维母细胞的浸润,从而减轻了肾纤维化程度^[9]。本研究采用单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral ligation, UUO)模型造成肾间质纤维化,进一步探讨黄芪甲苷抗肾间质纤维化作用及其与 TLRs 信号通路有关的机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康成年 C57BL/6 小鼠 50 只,体质量(20±5)g,由成都达硕实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(川)2015-030。小鼠分笼饲养于西南医科大学肾功能保护实验中心,予 12 h 光照、45%湿度的环境中,自由饮水,进食标准普通饲料。

1.2 主要药品和试剂

黄芪甲苷(批号 110702,质量分数 98%,溶于含 0.1%乙醇的双蒸水中),购自成都曼斯特科技有限公司;1%戊巴比妥钠(北京化学试剂公司);SPV 法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);ECL 检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);HE 和 Masson 染色试剂盒均购自索莱宝生物科技有限公司;DAB 显色试剂盒、肌酐(Cr)检测试剂盒、尿素氮(BUN)检测试剂盒均购自迈新科技有限公司;Western 印迹设备(Bio RAD 公司);TLR4 抗体(Abcam 公司);Toll 样受体 2(TLR2)抗体(Sigma 公司);髓样分化因子 88(MyD88)抗体(Cell Signaling Technology 公司);肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF-6)抗体(Abcam 公司);核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体(Abcam 公司); α -肌动蛋白(α -SMA)抗体(Sigma

公司);纤维黏连蛋白(Fibronectin)抗体、白细胞介素-6(IL-6)抗体(武汉博士德生物工程有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抗体(Abcam 公司); β -actin(碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器

PCR 扩增仪(基因公司);凝胶电泳仪、凝胶成像仪(Bio-rad 公司);吸收光酶标仪(Biotek 公司);倒置相差显微镜(Olympus 公司);微量核酸测量仪(基因公司);低温高速离心机(Eppendorf 公司);石蜡切片机(Leica 公司)。

2 方法

2.1 UUO 模型的制备

用 1%戊巴比妥钠对小鼠行 ip 麻醉后,备皮、消毒、铺巾,将小鼠右侧卧位固定于手术台上,行左侧腹纵行切口,依次切开皮肤至腹腔,暴露出肾脏,用生理盐水纱布覆盖于切口两侧,找到输尿管,剥离左侧输尿管,使之处于游离状态,分别在肾盂处和输尿管上三分之一处用丝线分别结扎,后切断结扎处的输尿管。术后将肾脏、输尿管放回原处,然后依次缝合肌肉层、皮肤层。假手术组除不结扎输尿管外,其余步骤同上。

2.2 分组及给药

将 50 只小鼠随机分为 5 组:模型组,黄芪甲苷高、中、低剂量(50、30、10 mg/kg)组,假手术组。模型组和黄芪甲苷各组按照“2.1”项方法进行手术造模,假手术组除不结扎输尿管外,其余步骤同上。从术后当天开始,黄芪甲苷各组 ig 给予黄芪甲苷溶液,模型组与假手术组 ig 给予同等体积生理盐水,每天 1 次,连续给药 14 d。所有小鼠按清洁级动物分笼喂养,小鼠自由饮水、进食,温度(23±2)℃,相对湿度为(55±2)%。

2.3 标本采集

于手术后第 14 天心脏采血,静置 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,待测。并取左肾组织,部分保存于 4%多聚甲醛液中,行石蜡包埋后,用于 HE 染色、Masson 染色和免疫组织化学检测;另一部分肾组织用液氮快速冷却后保存于-80℃冰箱以提取蛋白。

2.4 血清 Cr 和 BUN 水平测定

取血清,应用检测试剂盒通过酶标仪检测相应波段的吸光度(A)值,测定血清 Cr 和 BUN 水平。

2.5 肾组织 HE 染色和 Masson 染色

取石蜡包埋肾组织按常规方法操作分别进行

HE 染色和 Masson 染色。取 Masson 染色组织切片^[10] 每例切片选取 10 个不重复的视野 ($\times 400$ 倍), 以蓝色胶原沉积为阳性信号。用 Image Pro plus 多媒体彩色病理图像分析软件进行分析。计算肾间质胶原沉积面积与视野内肾小管间质总面积的比值并取平均值。

2.6 免疫组织化学染色检测相关蛋白表达

采用 SPV 法检测小鼠肾组织 TLR4、TLR2、MyD88、 α -SMA、Fibronectin、IL-6、TNF- α 的表达。取各组小鼠肾组织石蜡包埋, 5 μ m 切片, 烤片 2 h, 常规脱蜡复水, 1%过氧化氢溶液 37 $^{\circ}$ C 处理 10 min, 经抗原修复液加热修复自然冷却至室温后加抗体孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜。5%兔血清代替一抗作为空白对照。12 h 后加试剂 1(按试剂盒方法), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后, 加试剂 2(按试剂盒方法), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。DAB 显色 8 min, 苏木素衬染 5 min, 经梯度酒精脱水各 1 min, 二甲苯透明后中性树脂胶封片。组织呈黄褐色为阳性染色。采用 Image Pro plus 多媒体彩色病理图像分析软件进行分析。计算每例切片 10 个不重叠的 400 倍视野中, 阳性染色面积与视野内肾小管间质总面积的比值, 并取平均值。

2.7 Western blotting 法检测相关蛋白表达

按分子实验指南的方法进行裂解、抽提组织总蛋白, 采用 BCA 法定量蛋白浓度。取蛋白于 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 湿转至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加一抗, 室温摇床 30 min, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加相应二抗, 室温摇床 1 h, PBST 洗膜; ECL 检测液放射自显影。显影结果使用 Quantity one 软件进行积分吸光度值分析, 结果用 β -actin 校正。下列抗体各自稀释比: TLR4 (1 : 500)、TLR2 (1 : 1 000)、

TRAF-6 (1 : 1 000)、MyD88 (1 : 500)、NF- κ B (1 : 1 000)、 α -SMA (1 : 2 000)、 β -actin (1 : 1 000)。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 肾功能改变

模型组、假手术组以及黄芪甲苷各组小鼠血清中 Cr、BUN 水平差异不显著 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 黄芪甲苷对 UUO 小鼠血清 Cr 和 BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of astragaloside IV on Cr and BUN in serum of UUO mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Cr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
假手术	—	60.7 $\pm$ 4.8	10.90 $\pm$ 0.19
模型	—	63.9 $\pm$ 7.0	7.80 $\pm$ 0.23
黄芪甲苷	10	72.8 $\pm$ 0.7	10.10 $\pm$ 0.92
	30	71.9 $\pm$ 6.7	9.16 $\pm$ 1.16
	50	59.2 $\pm$ 3.8	8.70 $\pm$ 1.70

3.2 肾脏组织病理学改变

HE 染色 (图 1) 显示, 假手术组肾皮质、髓质结构正常, 肾小管及肾小球的大小、形态均未见异常, 肾小管间质无增宽、无明显充血及炎细胞浸润。模型组小鼠术后 14 d 左肾体积显著增大, 肾盂与肾盏扩张, 肾实质变薄; 光镜下可见不同程度的肾小管扩张、上皮细胞变性脱落; 肾间质可见不同程度的水肿及炎性细胞浸润; 部分肾小球不同程度的萎缩甚至消失, 有很明显的肾间质纤维化的表现如肾间质增宽、胶原沉积增加等。而黄芪甲苷组肾间质水肿、肾小球萎缩和炎性细胞浸润不如模型组明显, 有一定程度的肾间质增宽。

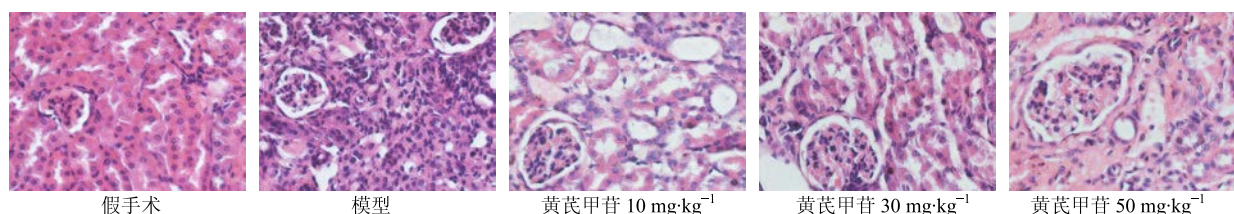


图 1 小鼠肾脏 HE 染色结果 ($\times 400$)

Fig. 1 Results of mouse kidney HE staining ($\times 400$)

3.3 肾脏组织纤维化改变

3.3.1 Masson 染色改变 Masson 染色 (图 2) 显示, 假手术组胶原染色主要位于小管基底膜及管周围, 而肾小管间质染色较少。与假手术组比较, 模

型组肾小管扩张, 肾间质增宽, 胶原成分明显增加; 黄芪甲苷组肾间质胶原沉积程度均较模型组减轻 ($P < 0.05$), 见图 3。证明单侧输尿管梗阻 14 d 后造成小鼠患侧肾明显的纤维化, 而黄芪甲苷能明显减

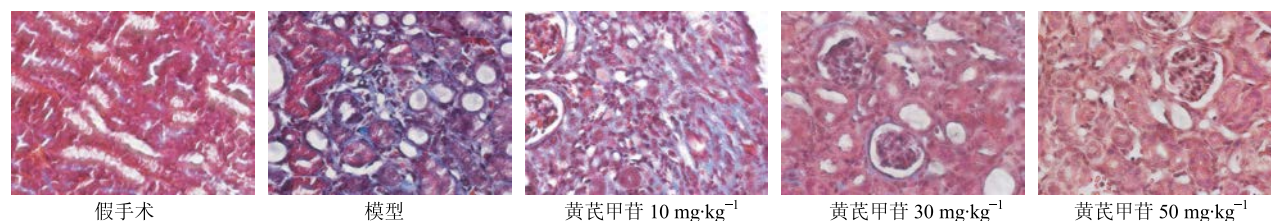
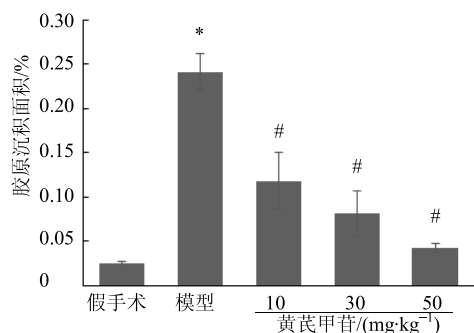


图 2 小鼠肾脏 Masson 染色结果 (×400)

Fig. 2 Masson staining of mouse kidney (×400)

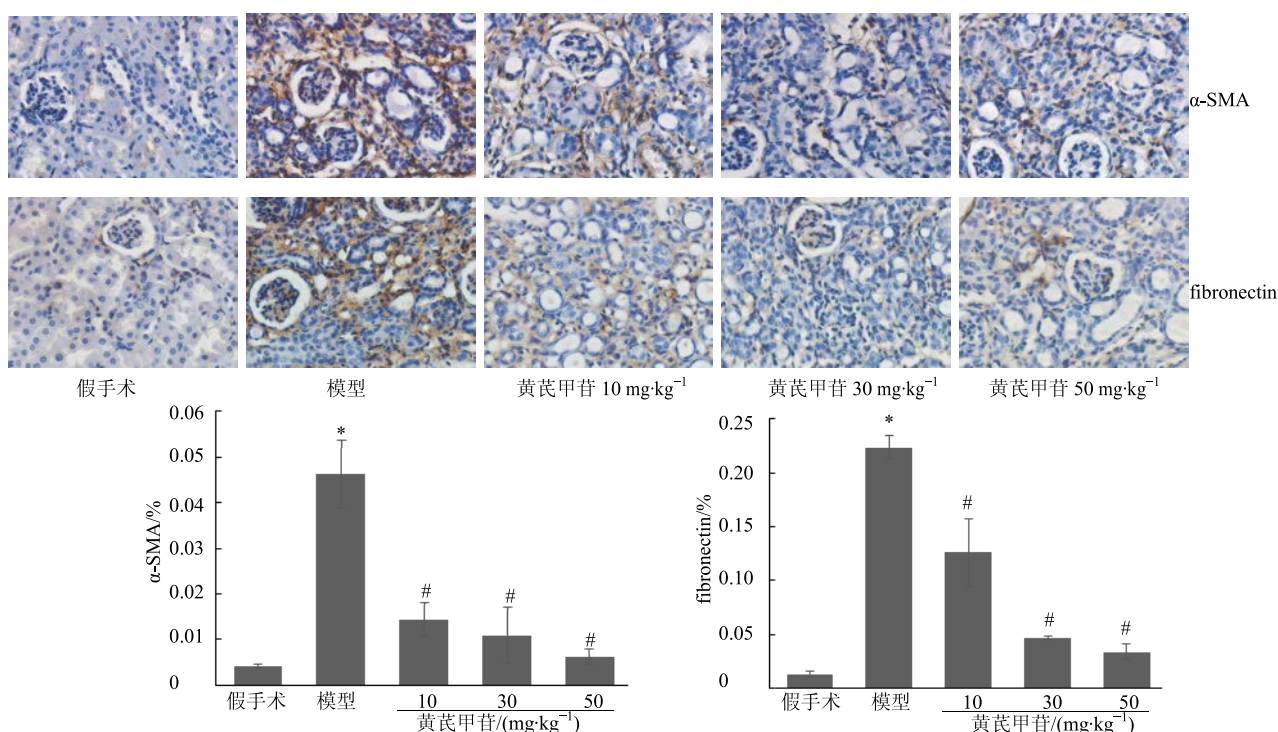


与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs model group, same as below Figs

图 3 小鼠肾脏 Masson 染色半定量分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Semi-quantitative analysis of mouse kidney by Masson staining ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

轻和改善 UUO 后小鼠的肾纤维化程度, 呈剂量依赖性地减少肾间质胶原蛋白的沉积。

3.3.2 肾组织 α -SMA 和 fibronectin 改变 α -SMA 和 fibronectin 免疫组化结果及图像分析软件处理结果 (图 4) 显示, α -SMA 和 fibronectin 阳性染色区域主要位于细胞间质, 模型组的 α -SMA 和 fibronectin 表达量均多于假手术组以及黄芪甲苷各组 ($P < 0.05$), 证明模型组的纤维化程度均大于假手术组和黄芪甲苷组。黄芪甲苷各组的纤维化程度均较模型组减轻 ($P < 0.05$), 且减轻作用呈剂量依赖关系, 与假手术组的 α -SMA 和 fibronectin 表达差别不显著 ($P > 0.05$)。

图 4 小鼠肾组织 α -SMA 和 fibronectin 免疫组化染色结果 (×400) 及其半定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 4 Immunochemical staining of α -SMA and fibronectin in mouse kidney tissue (×400) and semi-quantitative analysis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 肾脏组织 Toll/MyD88 依赖信号通路相关蛋白表达的改变

3.4.1 免疫组化检测 Toll/MyD88 依赖信号通路相

关蛋白阳性表达 通过 Toll/MyD88 依赖信号通路相关的分子 (TLR4、TLR2、MyD88) 免疫组化结果 (图 5) 及半定量分析 (表 2) 可知, TLR4、TLR2

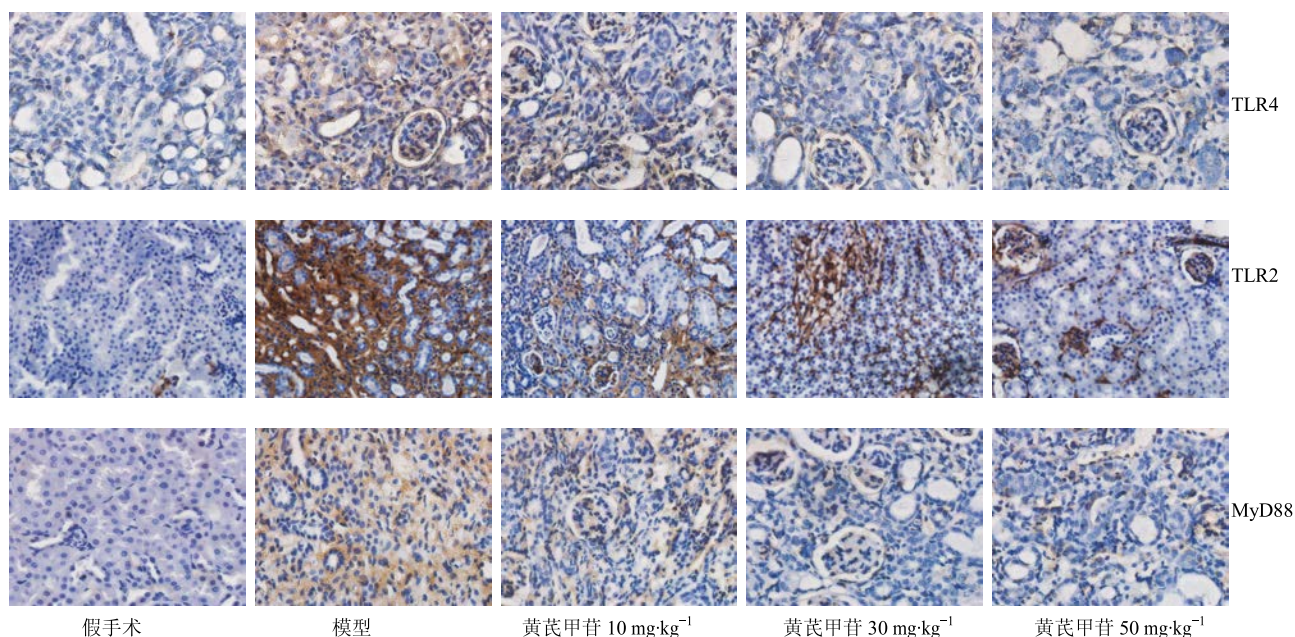


图 5 小鼠肾组织 TLR4、TLR2 和 MyD88 免疫组化染色结果 (×400)

Fig. 5 Immunochemical staining of TLR4, TLR2, and MyD88 in mouse kidney tissue (× 400)

表 2 Toll/MyD88 依赖信号通路相关的分子免疫组化结果分析 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Analysis of immunohistochemical staining of related molecules in Toll/MyD88 dependent signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TLR4	TLR2	MyD88
假手术	—	0.032 ± 0.050	0.007 ± 0.030	0.002 ± 0.001
模型	—	0.267 ± 0.010 [*]	0.123 ± 0.010 [*]	0.016 ± 0.005 [*]
黄芪甲苷	10	0.137 ± 0.050 [#]	0.064 ± 0.014 [#]	0.008 ± 0.002
	30	0.068 ± 0.070 [#]	0.045 ± 0.021 [#]	0.003 ± 0.001 [#]
	50	0.038 ± 0.020 [#]	0.032 ± 0.011 [#]	0.003 ± 0.002 [#]

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, 下表同

^{*} $P < 0.05$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group, same as below tables

阳性染色区域主要位于细胞膜, MyD88 阳性染色区域主要位于细胞浆, 模型组的表达量均多于假手术组以及黄芪甲苷组 ($P < 0.05$), 黄芪甲苷各组的蛋白表达量均较模型组降低 ($P < 0.05$), 且存在剂量依赖关系。通过模型组与假手术组之间差异可知, TLR4、TLR2 表达量增多与纤维化呈正比关系, 证实了 TLR4、TLR2 介导的免疫炎症反应参与了肾间质纤维化的过程, 且其表达量随肾间质纤维化程度的加重而升高, 通过 TLRs 的 MyD88 依赖途径机制而促进肾纤维化。而随着黄芪甲苷药物处理浓度升高, Toll/MyD88 依赖信号通路相关的蛋白的表达量逐渐减少, 证明黄芪甲苷减轻肾纤维化的作用机制有可能是调节 Toll/MyD88 依赖信号通路。

3.4.2 Western blotting 检测 Toll/MyD88 依赖信号通路相关蛋白的改变 通过对 Western blotting 条带

(图 6) 结果定量分析 (表 3) 可知正常肾对于 Toll/MyD88 依赖信号通路相关的分子蛋白 (TLR4、TLR2、MyD88、TRAF-6、NF- κ B) 均有表达, 其中 MyD88、NF- κ B 表达量相对较少, 模型组的相关分子蛋白表达均明显升高, 明显高于假手术组和黄芪甲苷各组 ($P < 0.05$)。黄芪甲苷中、高剂量组与假手术组 TLR4、TLR2、TRAF6、NF- κ B 的蛋白表达均无差异 ($P > 0.05$), 黄芪甲苷高剂量组和假手术组的 MyD88 蛋白表达无差异 ($P > 0.05$)。可见这些 Toll/MyD88 依赖信号通路重要节点蛋白表达随着黄芪甲苷药物处理浓度升高, 其蛋白表达量相应降低。证明随着加药浓度升高, 肾纤维化程度降低以及 Toll/MyD88 依赖信号通路相关的分子蛋白表达降低, 黄芪甲苷能使 Toll/MyD88 依赖信号通路表达下调。

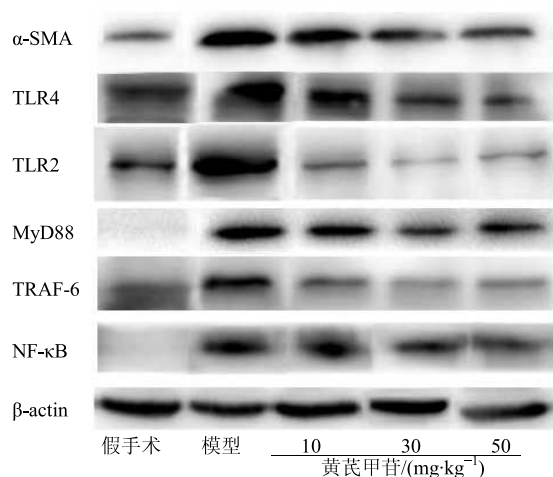


图6 Western blotting法检测 Toll/MyD88 依赖信号通路相关蛋白条带

Fig. 6 Western blotting analysis of related proteins in Toll/MyD88 dependent signaling pathway

对 α -SMA 的 Western blotting 条带定量分析(表3)可知模型组的 α -SMA 蛋白表达量明显多于假手术组 ($P < 0.05$), 且黄芪甲苷高、中剂量组与假手术组 α -SMA 的蛋白表达无差异 ($P > 0.05$)。可知黄芪甲苷可降低 α -SMA 蛋白的表达, 对于减轻肾纤维化程度有明显的防治效果, 且其治疗效果与药物浓度呈正相关关系。

3.5 肾脏组织炎症因子改变

通过 Toll/MyD88 依赖信号通路末端炎症因子 IL-6 和 TNF- α 免疫组化结果(图7)可知, 黄芪甲苷组肾脏组织炎症因子浸润, 程度明显轻于模型组 ($P < 0.05$), 且 IL-6 和 TNF- α 蛋白表达量(表4)在黄芪甲苷高剂量组与假手术组中比较差异不显著 ($P > 0.05$)。证实通过黄芪甲苷对 Toll/MyD88 依赖信号通路的调控, 抑制此通路末端炎症因子的释放, 最终可能会影响到黄芪甲苷的抗炎结果, 有明显减轻炎症的作用。

表3 各组肾脏组织中 Toll/MyD88 依赖信号通路相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Protein expression of related molecules in Toll/MyD88 dependent signaling pathway in each kidney tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	α -SMA	TLR4	TLR2	MyD88	TRAF-6	NF- κ B
假手术	—	0.98 ± 0.86	0.55 ± 0.23	1.66 ± 0.58	0.07 ± 0.01	1.33 ± 0.54	1.39 ± 0.90
模型	—	5.35 ± 0.42*	1.77 ± 0.46*	5.41 ± 0.59*	0.79 ± 0.05*	5.46 ± 1.10*	5.99 ± 1.20*
黄芪甲苷	10	2.78 ± 0.80 [#]	1.06 ± 0.32 [#]	3.36 ± 1.00 [#]	0.42 ± 0.11 [#]	3.45 ± 0.78	4.12 ± 0.45
	30	2.34 ± 0.32 [#]	0.92 ± 0.47 [#]	2.34 ± 0.56 [#]	0.31 ± 0.06 [#]	2.29 ± 0.35 [#]	2.67 ± 0.18 [#]
	50	2.27 ± 0.58 [#]	0.62 ± 0.18 [#]	2.19 ± 0.63 [#]	0.22 ± 0.11 [#]	2.04 ± 0.43 [#]	2.47 ± 0.24 [#]

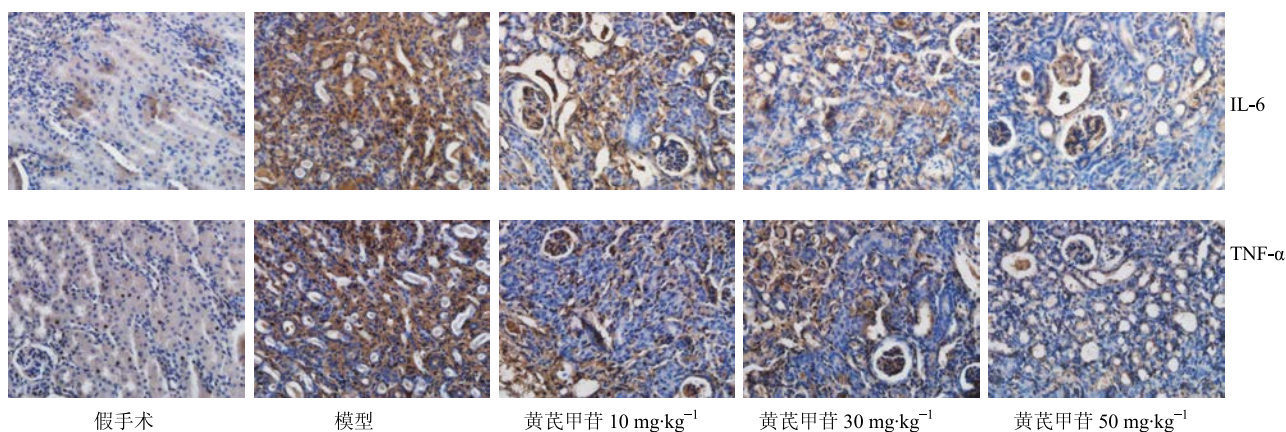


图7 小鼠肾组织 IL-6 和 TNF- α 免疫组化结果 (×400)

Fig. 7 Immunochemical staining of IL-6 and TNF- α in mouse kidney tissue (×400)

4 讨论

肾纤维化病理改变存在于整个肾脏疾病慢性化病程中, 减轻甚至逆转肾纤维化是一年以来对治疗慢性肾脏疾病的研究目标。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分之一, 有大量的研究已确证黄芪甲苷能

改善减轻肾纤维化程度^[11]。并且在很多治疗肾脏疾病中药复方中, 黄芪是一味常见的中药^[7,12-13]。通过此研究, 更加完善黄芪甲苷改善减轻肾纤维化的作用机制, 并为改良中药复方提供指导。

肾纤维化是肾脏在各种致病因子如炎症、损伤等

表 4 Toll/MyD88 依赖信号通路末端炎症因子免疫组化结果分析 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Analysis on immunohistochemical staining of terminal inflammatory cytokines in Toll/MyD88 dependent signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6	TNF-α
假手术	—	0.014±0.011	0.003±0.001
模型	—	0.144±0.024 [*]	0.100±0.015 [*]
黄芪甲苷	10	0.088±0.028 [#]	0.062±0.008 [#]
	30	0.033±0.004 [#]	0.034±0.001 [#]
	50	0.028±0.004 [#]	0.020±0.010 [#]

作用下的病理修复反应,其病理特点主要包括细胞炎性改变、细胞外基质增多、成纤维细胞积累等^[14]。而TLRs 近年被认为诱导性炎症的主要因素,可通过激活病原相关模式和损伤相关模式,经过中间接头蛋白的介导激活相关信号激酶,导致转录因子活化,从而使炎症效应分子转录表达,完成天然免疫应答或激活获得性免疫反应和炎症反应,从而参与肾脏急性慢性组织炎症反应^[15]。在信号级联放大中,有 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径 2 个途径。MyD88 依赖信号转导途径是除 TLR3 外 TLR 信号转导的共同通路,可以调控 IL-6、TNF、IFN-γ、IL-12 和 IL-4 等的分泌^[16-17]。在 MyD88 依赖的途径中,TLRs 通过 MyD88 募集和活化下游相关信号激酶和 TRAF-6,进而激活丝裂原激活的蛋白激酶、干扰素调节因子 5 和 NF-κB 通路完成末端炎症因子 IL-1β、TNF-α 的释放^[18]。同时也有越来越多的研究表明,TLR4、TLR2、TLR7 等受体以及 MyD88 在肾脏的高表达有促纤维化的作用,TLR9 的高表达有减轻肾纤维化的作用^[19-25]。并也有实验已证实黄芪甲苷可通过 TLRs 通路减轻炎症反应改善心肌肥厚^[26]。因此,本研究将 TLR4、TLR2、MyD88、TRAF-6、NF-κB 作为此通路重要节点检测分子,以反映 Toll/MyD88 依赖信号通路在 UUO 引起小鼠肾纤维化的炎症反应中发生的改变,并通过对末端炎症因子 IL-6 及 TNF-α 的检测来反映该信号通路对炎症因子的调控作用。

本研究结果显示,模型组、假手术组以及黄芪甲苷各组的血清 Cr、BUN 水平差别不大($P > 0.05$),没有统计学意义。可能原因是另一侧健康肾能代偿患侧肾的损伤,肾功能没有出现明显的临床表现。

通过 Masson 染色结果显示单侧输尿管结扎后造成了模型组小鼠患侧肾胶原成分明显增加,黄芪

甲苷组和假手术组肾间质胶原沉积程度均较模型组减轻($P < 0.05$)。从 α-SMA 和 fibronectin 的免疫组化半定量结果可知,黄芪甲苷组和假手术组蛋白表达量明显低于模型组($P < 0.05$),且高剂量组和中剂量组与假手术组的蛋白表达差别不大($P > 0.05$)。并通过对 α-SMA 的 Western blotting 条带定量分析可知模型组的蛋白表达量明显多于假手术组($P < 0.05$),且黄芪甲苷高、中剂量组与假手术组 α-SMA 的蛋白表达无差异($P > 0.05$)。证实黄芪甲苷可以明显地改善和减轻单侧输尿管结扎后造成的肾纤维化程度,且其防治效果与药物浓度呈正比关系。

Toll/MyD88 依赖信号通路上游重要节点分子 Western blotting 及免疫组化结果显示,模型组的蛋白表达均明显升高,高于假手术组和黄芪甲苷组($P < 0.05$),且黄芪甲苷呈剂量依赖性地抑制该信号通路的相关因子,其中中、高剂量组与假手术组 TLR4、TLR2、TRAF-6、NF-κB 的蛋白表达均无差异($P > 0.05$),高剂量组和假手术组的 MyD88 蛋白表达无差异($P > 0.05$)。因此证实 Toll/MyD88 依赖信号通路相关蛋白的表达与小鼠患侧肾纤维化程度成正相关,TLR4、TLR2 等的高表达有促肾纤维化的作用,而黄芪甲苷能抑制 Toll/MyD88 依赖信号通路上重要节点分子的表达,可知黄芪甲苷可能通过下调 Toll/MyD88 依赖信号通路减轻肾纤维化。

通过 IL-6 和 TNF-α 这 2 个通路末端炎症因子的免疫组化结果显示,假手术组和黄芪甲苷各组肾组织炎症因子浸润程度明显轻于模型组($P < 0.05$),且 IL-6 和 TNF-α 蛋白表达在高剂量组与假手术组中差别不大($P > 0.05$)。证实黄芪甲苷对此通路末端炎症因子的释放有抑制作用,通过下调此通路,抑制通路末端炎症因子的释放达到抗炎作用,可减轻肾纤维化过程中的免疫炎症反应。

综上所述,黄芪甲苷能明显改善肾纤维化程度,其作用机制可能是通过下调 Toll/MyD88 依赖信号通路重要节点分子表达和抑制末端通路炎症因子的释放,呈剂量依赖性地抑制该信号通路上各节点分子蛋白水平,从而减缓肾纤维化的发展。

参考文献

- [1] Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure [J]. *J Amer Soc Nephrol*, 2006, 17(1): 17-25.
- [2] 辛冰牧,杨红振. 肾纤维化发病机制及治疗学研究进

- 展 [J]. 国际药理学杂志, 2008, 35(5): 349-354.
- [3] 章雪莲, 朋红霞, 王亿平, 等. 单味中药防治肾脏纤维化研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(10): 874-876.
- [4] 黎凤仪. 肾纤维化的中西医治疗进展 [J]. 山西中医, 2013, 29(5): 55-58.
- [5] 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.
- [6] 罗 婷, 程锦国, 姜程曦, 等. 清化固肾排毒颗粒对肾纤维化大鼠 Wnt 通路 Wnt1 和 β -catenin 表达的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 955-962.
- [7] 朱 伟, 唐 英, 何立群, 等. 黄芪甲苷对肾间质纤维化的拮抗作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 1(12): 2700-2702.
- [8] 李在楠. Toll 样受体 4 在肾间质纤维化中的表达及意义 [J]. 贵州医药, 2013, 37(10): 867-873.
- [9] Wang S J. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88-and TRIF-dependent signaling [J]. *Dis Models Mech*, 2010, 3(1/2): 92-103.
- [10] Mizuguchi Y, Miyajima A, Kosaka T, et al. Atorvastatin ameliorates renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction [J]. *J Urol*, 2004, 172(6): 2456-2459.
- [11] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 954-960.
- [12] 徐维佳. 黄芪甲苷通过 MAPK 信号通路对肾小管间质纤维化的作用及其机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [13] 黎凤仪. 肾纤维化的中西医治疗进展 [J]. 山西中医, 2013, 29(5): 55-58.
- [14] Zeisberg M, Neilson E G. Mechanisms of Tubulointerstitial Fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(11): 1819-1834.
- [15] Yiu W H. Toll-like receptor activation: from renal inflammation to fibrosis [J]. *Kidney Int Suppl*, 2014, 4: 20-25.
- [16] 常晓彤, 蔡晓峰, 王振辉. Toll 样受体信号转导途径研究进展 [J]. 生理科学进展, 2011, 42(5): 340-346.
- [17] 吴燕燕, 王 易. Toll 样受体信号通路中 MyD88 的研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(3): 262-265.
- [18] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650.
- [19] Souza A C P, Takayuki T. TLR4 mutant mice are protected from renal fibrosis and chronic kidney disease progression [J]. *Physiol Rep*, 2015, 3(9): e12558.
- [20] Xin B M. Activation of Toll-like receptor 9 attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 1583-1592.
- [21] Skuginna V. Toll-like receptor signaling and SIGIRR in renal fibrosis upon unilateral ureteral obstruction [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19204.
- [22] Wu H L. Requirement for TLR2 in the development of albuminuria, inflammation and fibrosis in experimental diabetic nephropathy [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(2): 481-495.
- [23] d'Andon M F. *Leptospira interrogans* induces fibrosis in the mouse kidney through inos-dependent, TLR-and NLR-independent signaling pathways [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(1): e2664.
- [24] 朱亚利. 白芍总苷通过下调 TLR4/NF- κ B/TGF- β 1 信号通路改善阿霉素肾病大鼠肾纤维化 [J]. 中国生化药物杂志 2015, 35(7): 43-46.
- [25] Wermuth P J. Gd compounds signaling through Toll-like receptors 4 and 7 in normal human macrophages: establishment of a proinflammatory phenotype and implications for the pathogenesis of nephrogenic systemic fibrosis [J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 318-327.
- [26] 何海洋. 黄芪甲苷对心肌肥厚的抑制作用与 TLR-4/NF-kappa B 信号通路相关 [D]. 沈阳: 辽宁医学院, 2013.