

楔叶茶藨与东北茶藨子抗肾纤维化的药效差异研究

吴焱亮¹, 王艳革¹, 谷丽菲¹, 张春磊¹, 余伯阳^{2,3}, 柴程芝^{1,2*}

1. 中国药科大学中药学院 中药药理与中医药学系, 江苏 南京 211198

2. 中国药科大学 江苏省中药评价与转化重点实验室, 江苏 南京 211198

3. 中国药科大学 中药可追溯与标准化研究中心, 江苏 南京 211198

摘要: **目的** 比较 2 种虎耳草科植物楔叶茶藨 (RDP) 和东北茶藨子 (RMK) 抗肾纤维化的药效作用差异。 **方法** 采用体外实验与体内实验相结合的方法, 利用转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 诱导的人肾小管上皮细胞 (HK-2) 纤维化模型和单侧输尿管结扎 (UUO) 诱导的小鼠肾纤维化模型, 综合运用 HE 染色、Masson 染色, 免疫组化, 免疫印迹等方法, 以细胞形态、细胞长度与宽度比值, 肾脏组织病理损伤程度, 肾脏组织中 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的蛋白表达等为主要观测指标, 比较 RDP 和 RMK 提取物对各项指标的影响; 采用偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA) 法, 对 RDP 和 RMK 治疗组小鼠肾脏组织病理学评分进行分析。 **结果** RDP 提取物 (1.5、5、15 $\mu\text{g/mL}$) 与 RMK 提取物 (3、10 $\mu\text{g/mL}$) 均可以有效改善 TGF- $\beta 1$ 诱导的 HK-2 细胞形态改变, 减小细胞长度与宽度比值; RDP (40 mg/kg) 与 RMK (80 mg/kg) 均能显著减少 UUO 模型小鼠 α -SMA 表达和增加 E-cadherin 的蛋白表达, 并减轻病理性损伤和纤维化程度; PLS-DA 分析显示, RDP 和 RMK 改善 UUO 诱导肾脏组织纤维化的作用无明显差异。 **结论** RDP 和 RMK 体内外对肾纤维化均具有一定的保护作用, RMK 和 RDP 对各项指标的改善作用无明显差别。

关键词: 楔叶茶藨; 东北茶藨子; 肾纤维化; TGF- $\beta 1$; 人肾小管上皮细胞; 偏最小二乘-判别分析

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)01-0127-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.018

Pharmacodynamic difference of *Ribes diacanthum* and *Ribes mandshuricum* on renal fibrosis

WU Yan-liang¹, WANG Yan-ge¹, GU Li-fei¹, ZHANG Chun-lei¹, YU Bo-yang^{2,3}, CHAI Cheng-zhi^{1,2}

1. Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

3. Research Center for Traceability and Standardization of TCMs, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: **Objective** To compare pharmacodynamic difference of *Ribes diacanthum* (RDP) and *Ribes mandshuricum* (RMK) treatment on renal fibrosis *in vivo* and *in vitro*. **Methods** Both of TGF $\beta 1$ -induced HK-2 cell fibrosis model and UUO-induced kidney fibrosis mice model were used in the present study. The cell morphology, ratio of cell length to width, renal histopathology, protein expressions of α -SMA and E-cadherin in kidney tissues were evaluated through biological and pharmacological methods and technologies, including Western blot, immunohistochemistry, HE staining, Masson staining and so on. In addition, partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was applied to analyze the renal histopathological score as well. **Results** RDP (1.5, 5, 15 $\mu\text{g/mL}$) and RMK (3, 10 $\mu\text{g/mL}$) effectively improved morphological changes and reduced the ratio of cell length to width in TGF $\beta 1$ -induced HK-2 cell fibrosis; Moreover, RDP (40 mg/kg) and RMK (80 mg/kg) remarkably decreased the expression of α -SMA and increased the expression of E-cadherin in UUO mice model. The degree of pathological damage and fibrosis were also alleviated in both groups. PLS-DA analysis showed no significant difference in anti-fibrotic effects between RDP and RMK treatment.

收稿日期: 2019-07-11

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目: 楔叶茶藨肾保护活性物质基础及作用机制研究 (81603389); 江苏省自然科学基金面上项目: 基于转化医学研究楔叶茶藨肾保护作用的物质基础及作用机制研究 (BK20160754)

作者简介: 吴焱亮 (1993—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药复方的药效及作用机制研究。Tel: 15952056701 E-mail: 15077303759@163.com

***通信作者** 柴程芝 (1973—), 女, 硕士生导师, 副主任中医师, 研究方向为中药复方的药效及作用机制研究。

Tel: 13451857745 E-mail: chaichengzhi@126.com

Conclusion Both RDP and RMK have anti-fibrosis effects on TGF β 1-induced HK-2 cell fibrosis model and UUO-induced kidney fibrosis mice model, and there is no significant difference between these two herbs.

Key words: *Ribes diacanthum* Pall.; *Ribes mandshuricum* (Maxim.) Kom.; renal fibrosis; TGF- β 1; HK-2; PLS-DA

楔叶茶藨 *Ribes diacanthum* Pall. (RDP), 正名为双刺茶藨子, 属虎耳草科 (Saxifragaceae) 茶藨属 *Ribes* Linn. 植物, 主要分布于中国的内蒙古、黑龙江北部、吉林东部以及朝鲜、蒙古东北部、俄罗斯的西伯利亚^[1], 是蒙古人民最重要的药用植物之一。东北茶藨子 *Ribes mandshuricum* (Maxim.) Kom., (RMK) 同属于虎耳草科茶藨属落叶灌木, 主要分布于中国东北地区的黑龙江、吉林、辽宁等省, 在朝鲜北部和西伯利亚也有分布^[2]。RDP 地上部分 (叶、茎、果实) 的水提物在蒙古民间常用来治疗泌尿系统疾病, 具有利尿、排石、改善脉络膜的可塑性以及消肿作用^[3]。《内蒙古植物药志》中也记载 RDP 水提物具有解毒消肿、疏风清热的功效, 同时具有利尿、排石的作用^[4]。目前, 关于 RMK 的报道主要集中在果实的营养成分研究方面, 发现其中富含有机酸和维生素 C^[5-6], 含有丰富的脂肪酸, 可直接食用或者作为保健食品入药^[7], 目前已有茶藨子复合饮料成功研制以及茶藨子茶上市^[8]。研究还发现, RMK 的根和叶中均含有黄酮类成分, 具有较高的医疗价值^[9]。到目前为止, 关于 RMK 的药理学研究报道还比较少。本课题组新近研究发现, 蒙古民间用于治疗泌尿系统疾病的 RDP 对单侧输尿管结扎 (UUO) 诱导的小鼠肾间质纤维化具有保护作用^[10], 前期的化学成分研究发现从 RMK 中分离得到的化合物结构类型与产自蒙古的 RDP 化学成分有着很大的相似性^[11-12]。基于 RDP 植物资源比较稀缺且不易获得, RMK 资源丰富且药理活性研究较少, 本研究在课题组前期研究的基础上, 拟采用体内外研究相结合的方法, 比较 RMK 和 RDP 抗肾纤维化的药理活性差异, 以期拓展 RMK 的临床用途, 并促进其研究与开发提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞和动物

人肾小管上皮细胞 (HK-2) 由东南大学附属中大医院肾脏病研究所刘必成教授课题组馈赠; ICR 雄性小鼠, 4 周龄, 体质量 18~22 g, SPF 级, 由扬州大学比较医学动物中心提供, 合格证号 SCXK (苏) 2016-0007, 动物饲养在 12 h 明暗交替, 温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 和湿度 (50 $\pm$ 10) % 恒定的环境中, 自

由饮水及摄食, 适应性饲养 3 d 后开始实验。

1.2 试剂与药物

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、RPMI 1640 培养基、胎牛血清、Trypsin 胰酶, 美国 Sigma 公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), 英国 Abcom 公司; E-钙黏蛋白 (E-cadherin), 美国 CST 公司; GAPDH、Tubulin, 巴傲得生物科技有限公司; IRDye (680RD) 标记的二抗, 美国 LICOR 公司; 戊巴比妥钠, 广州捷倍斯生物科技有限公司; 即用型免疫组化试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司; RDP 的地上部分 (茎、叶和果实) 于 2014 年 9 月采自蒙古国 Khentii 山脉, RMK (茎、叶) 于 2015 年 9 月购自中国吉林省通化市, 均由中国药科大学中药资源系生药学专业余伯阳教授鉴定, RDP 为楔叶茶藨 *Ribes diacanthum* Pall. 的地上部分, RMK 为 *Ribes mandshuricum* (Maxim.) Kom. 的茎、叶, 标本存放于中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室。

1.3 仪器

TS-2 型水平摇床, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Rev-A 型垂直电泳仪, 北京伯乐生命科学发展有限公司; GS-1580R 型高速冷冻离心机, 基因有限公司; RE-2000 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; HH-6 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 上海一凯仪器设备有限公司; WXTL-2400 连续变倍双目体式显微镜, 上海精贤光电科技有限公司; 细胞培养箱, 美国赛默飞世尔公司; 生物安全柜, 西班牙 Telstar 公司; JE1002 型电子天平, 上海浦春计量仪器有限公司; 奥德赛近红外成像仪, LICOR 公司; LDZF-30KB-II 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂。

2 方法

2.1 实验药物的配制

RDP 和 RMK 提取物的制备^[13]: 称量干燥 RDP、RMK 各 50 g, 按照 1:10 的料液比加入水 500 mL, 浸泡过夜, 回流提取 3 次, 每次 4 h。合并提取液, 减压回收水, 冷冻干燥后分别得 RDP 提取物 (得率为 14.3%, 主要成分为黄酮类、酚酸类、木脂素等^[11]) 和 RMK 提取物 (得率为 7.5%, 主要成分为黄酮类、酚酸类、木脂素等^[12])。两者均以黄酮类为主要成

分。使用前加蒸馏水溶解至适当质量浓度。

2.2 RDP 和 RMK 对 TGF- β 1 诱导 HK-2 细胞纤维化的作用比较

将 HK-2 细胞按照 6×10^4 个/mL 每孔 100 μ L 的密度接种于 96 孔培养板, 在培养箱孵育 12 h, 换无血清培养基固定 1 h。先加入 RDP 提取物 (0.5、1.5、5、15 μ g/mL) 或 RMK 提取物 (1、3、10、30 μ g/mL), 30 min 后再加入 TGF- β 1 (5 ng/mL), 每个质量浓度重复 3 次; 另设置对照组 (含 1% DMSO), 模型组 (TGF- β 1, 5 ng/mL)。于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中培养 24 h, 显微镜下观察细胞形态的改变, 计算细胞长度与宽度比值。

2.3 RDP 和 RMK 对 UUO 模型小鼠肾纤维化的保护作用比较

2.3.1 分组及给药 将 60 只雄性 ICR 小鼠, 进行称重记录后随机分为 6 组, 即假手术组、模型组、RDP 对照组 (40 mg/kg)、RMK 对照组 (80 mg/kg)、RDP 治疗组 (40 mg/kg)、RMK 治疗组 (80 mg/kg), 每组 10 只小鼠。药物对照组和药物治疗组按相应剂量 (前期实验针对 RDP 和 RMK 改善 UUO 肾纤维化的最佳剂量进行了筛选, 发现 RDP 在 40 mg/kg 保护效果最佳, 而 RMK 在 80 mg/kg 抑制肾纤维化的效果最佳, 因此采用这 2 个剂量进行比较。折算成生药量, RDP 为 0.28 g/kg, RMK 为 1.06 g/kg) 连续 ig 相应药物 7 d, 假手术组和模型组连续 ig 蒸馏水 7 d。

2.3.2 UUO 模型小鼠的制备^[14] 手术前先将手术器械进行灭菌消毒, 用戊巴比妥钠 70 mg/kg ip 将小鼠麻醉, 将其固定在手术台, 在左侧腰肋下行 1~1.5 cm 处附近剪毛, 暴露腹部皮肤, 用碘伏消毒之后, 逐层剪开外皮和内皮, 注意避免剪到血管, 暴露左侧肾脏并分离输尿管, 在近肾盂处用 4 号手术专用缝合线结扎输尿管, 分层缝合伤口后用碘伏消毒, 用青霉素钠 10 mL/kg (40 万单位) im 以防术后伤口感染。假手术组只分离输尿管, 但不结扎, 其余操作均与模型组相同。术后伤口每日进行碘伏消毒。造模 1 d 后开始给药。

2.3.3 标本采集 术后第 8 天采用毛细管对小鼠进行眼底静脉丛取血后, 给予戊巴比妥钠 70 mg/kg 麻醉, 剪开纵膈附近皮肤暴露心脏, 剪断左心耳, 灌注针自心尖部插入心脏, 并剪开腹腔暴露肾脏, 用新配的 PBS 灌注至肾脏为无色时, 取左肾, 取一半用锡箔纸标记清楚后迅速放入液氮用于免疫印迹分

析, 另一半放入 10% 福尔马林中固定 24 h 后常规石蜡包埋、切片、染色。

2.3.4 肾组织病理学检查 以上各组小鼠在心脏灌注后, 迅速摘取右侧肾脏, 用 10% 福尔马林溶液固定 24 h, 随后进行脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡和水化, 将切片分别进行 HE 和 Masson 染色, 每组小鼠随机选 3 张肾脏组织切片用于观察病理学变化。HE 染色根据各组小鼠肾脏组织包膜下病变, 肾盂扩张, 乳头坏死, 肾小管管腔扩大、萎缩、变性、管型, 肾间质炎症、纤维增生的病理改变程度, 由轻到重依次定量为轻微或极少量 “0.5 分”, 轻度或少量 “1 分”, 中度或较多 “2 分”, 重度或多量 “3 分”, 极重度或大量 “4 分”, 无明显病变为 “0 分”。Masson 染色根据各组小鼠肾脏中增生的纤维组织面积 (蓝绿色面积) 占比进行定量。

2.3.5 免疫组化法检测小鼠肾脏组织 α -SMA 的表达与分布 首先将石蜡切片进行抗原抗体修复, 其次用封闭液室温封闭 30 min, 后加入兔抗鼠 α -SMA (1:100)、二抗和三抗工作液, 各 30 min, 再加入 DAB 显色剂 2.5 min, 最后冲洗、复染, 脱水、透明、封片, 在显微镜下观察阳性反应的变化。 α -SMA 免疫组化根据各组小鼠肾脏组织中 α -SMA 蛋白阳性表达面积占比进行定量。

2.3.6 免疫印迹法检测小鼠肾脏组织 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白的表达水平 准确称量各组小鼠肾脏组织 50 mg, 在液氮中研碎后迅速加入 500 μ L 4 $^{\circ}$ C 预冷的总蛋白提取试剂, 在匀浆器中充分研磨后转移至 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 后取上清, 加入上样缓冲液, 制备好上样样品。经 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转膜、封闭、依次加入兔抗鼠 α -SMA (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000) 及 GAPDH (1:5 000)、Tubulin 一抗 (1:5 000)、IRDye (680RD) 标记的二抗。图像通过奥德赛近红外双荧光扫描系统分析。显影条带采用 Image Studio 软件测量其吸光度, 分别以 GAPDH 和 Tubulin 为内参, 计算各组蛋白相对表达量。

2.4 统计学分析

用 Excel 处理数据后, 采用 GraphPad (Version 5.0) 进行统计学分析, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Students' *t* 检验进行两组间的比较; 采用 ANOVA 中的 Dunnett' 检验进行 3 组或 3 组以上的比较。

3 结果

3.1 RDP 和 RMK 对 TGF- β 1 诱导 HK-2 细胞纤维化的影响

如图 1 所示, 正常的 HK-2 细胞形态呈椭圆形铺路石样, 当给予 TGF- β 1 刺激后, 细胞变为梭形, 且排列不规则, 细胞长度与宽度比值与对照组相比, 升高至 1.44、1.49 倍 ($P < 0.01$); 与模型组相比, RDP 提取物 (1.5、5、15 $\mu\text{g/mL}$) 和 RMK 提取物 (3、10 $\mu\text{g/mL}$) 均可以显著改善 TGF- β 1 诱导的细胞形态学改变, 抑制细胞长度与宽度比值的增加。提示 RDP

和 RMK 对 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞纤维化均具有保护作用。除此之外, RDP 提取物的有效质量浓度为 1.5~15 $\mu\text{g/mL}$, RMK 提取物有效质量浓度为 3~10 $\mu\text{g/mL}$ 均处于 1.5~15 $\mu\text{g/mL}$ 内, 且两者对细胞长度与宽度比值的有效抑制率相似 (9.78%、16.73%、18.03% vs 5.91%、11.03%), 说明两者体外抗纤维化活性无明显差异。

3.2 RDP 和 RMK 对 UO 模型小鼠肾纤维化的影响

3.2.1 肾组织 HE 染色观察结果 实验结果 (图 2) 表明, 假手术组及 RDP、RMK 对照组小鼠肾小管

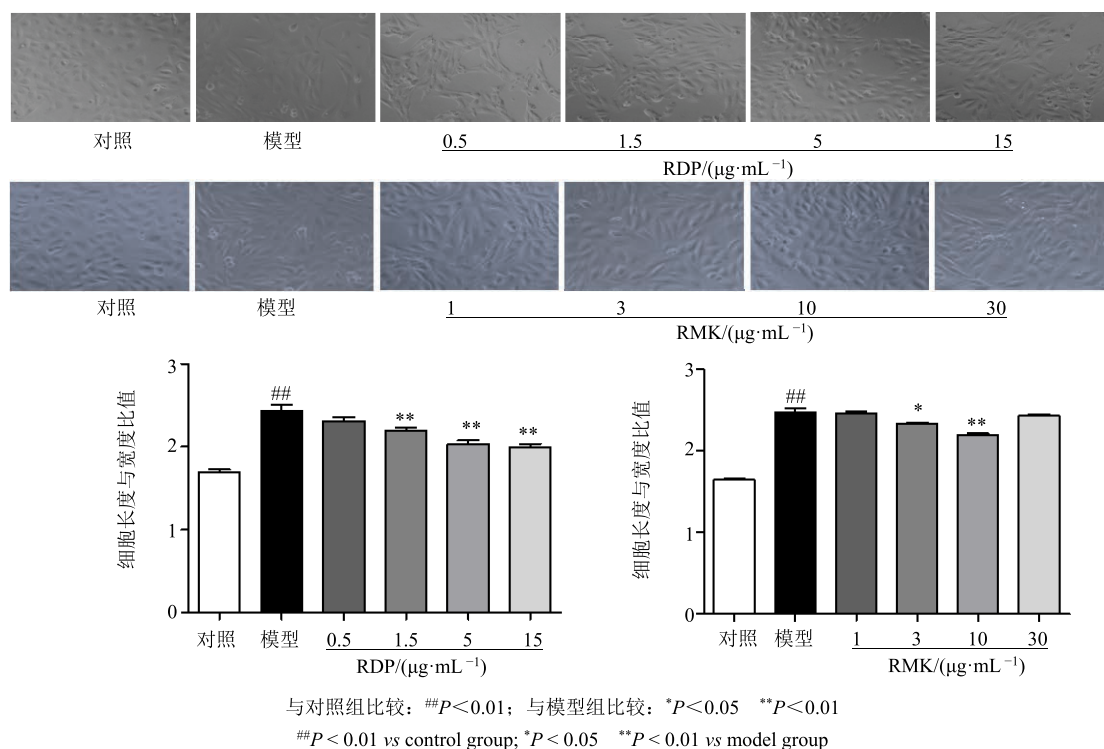


图 1 RDP 与 RMK 提取物对 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞纤维化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of RDP and RMK on TGF- β 1-induced HK-2 cell fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

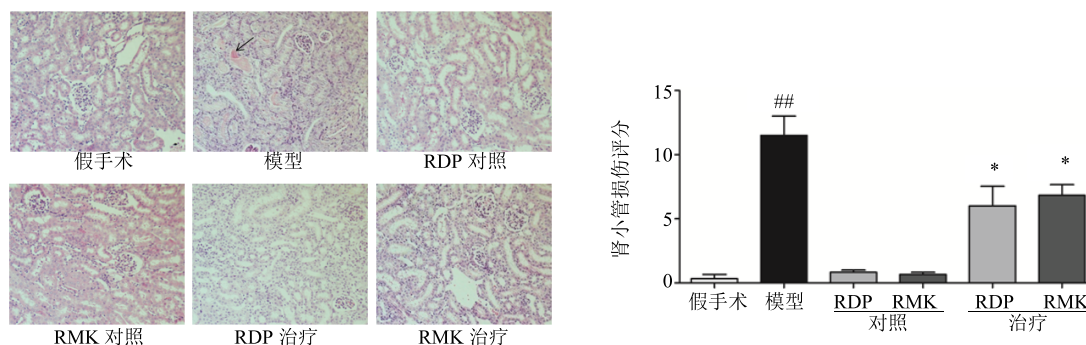


图 2 各组小鼠肾组织 HE 病理观察结果 ($\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 HE staining results of renal tissue of mice in each group ($\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$)

上皮细胞排列整齐,肾小管无萎缩,肾小管腔无扩大,肾小管间质无炎性细胞浸润,肾脏未见明显病理改变。与假手术组相比,模型组小鼠肾脏组织可见部分肾小管上皮细胞变性,变性细胞的形态学表现为细胞边界不清,核固缩或消失,萎缩的肾小管表现为小管变小,排列紧密,肾盂扩张,肾小管腔内有透明管型,肾间质纤维增生并伴有大量炎性细胞浸润,与假手术组相比,半定量分析数据差异显著 ($P<0.01$)。与模型组相比,RDP 及 RMK 治疗组小鼠肾脏病变如肾盂扩张、肾小管萎缩、肾间质纤维化等均明显减轻,半定量分析数据差异显著 ($P<0.05$)。RDP 与 RMK 治疗组之间小鼠肾脏病变减轻程度无明显差异。

3.2.2 肾组织胶原纤维染色 (Masson) 观察结果 如图 3 所示,假手术组和 RDP、RMK 对照组小鼠肾组织无结缔组织增生。与假手术组相比,模型组小鼠肾间质可见大量纤维组织增生,增生的纤维组织主要位于肾盂黏膜下区,呈蓝绿色反应,纤维化程度显著高于假手术组 ($P<0.01$)。而与模型组相比,RDP、RMK 治疗组小鼠肾间质可见极少量纤维组织增生,肾间质

纤维化明显改善。RDP 治疗组与 RMK 治疗组相比,两者抗纤维组织增生的作用无明显差异。

3.2.3 肾组织 α -SMA 分布及表达结果 α -SMA 是肌成纤维细胞的标志蛋白,在肾纤维化过程中发挥着重要的作用。免疫组化法检测 α -SMA 表达的结果显示,假手术组及 RDP、RMK 对照组小鼠肾组织中 α -SMA 蛋白仅有少量表达;与假手术组相比,模型组小鼠肾组织中 α -SMA 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$);与模型组相比,RDP 及 RMK 治疗组小鼠 α -SMA 蛋白阳性表达面积均明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。RDP 与 RMK 治疗组在降低 α -SMA 蛋白阳性表达面积上无明显差异。结果见图 4。

3.2.4 肾组织 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白表达水平测定结果 如图 5 所示, α -SMA 在假手术组和 RDP、RMK 对照组有极少量表达;与假手术组相比,模型组小鼠肾组织中 α -SMA 蛋白表达升高 11.37 倍,差异显著 ($P<0.01$);与模型组相比,RDP 及 RMK 治疗组小鼠肾组织中 α -SMA 蛋白表达均有所降低 ($P<0.05$),其抑制率分别为 49.23%和 52.79%。在假手术组和 RDP、RMK 对照组有大量 E-cadherin

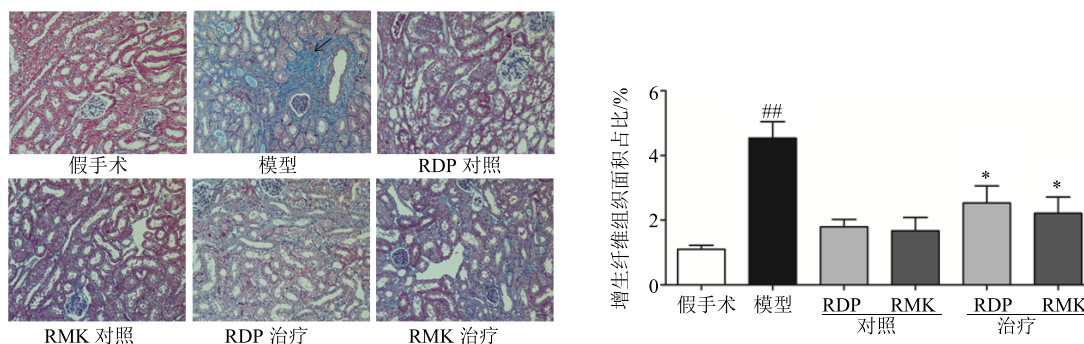


图 3 各组小鼠肾组织胶原纤维 Masson 染色结果 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Masson staining results of renal tissue of mice in each group ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

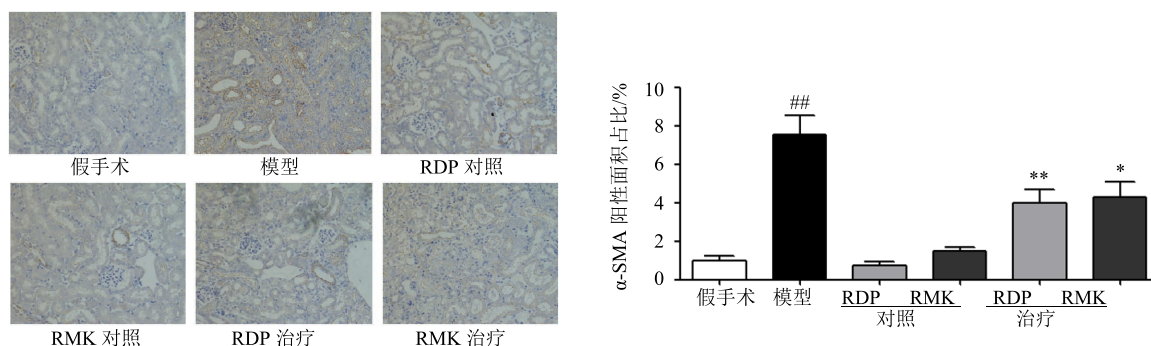


图 4 各组小鼠 α -SMA 免疫组化染色观察结果 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Protein expressions of α -SMA observed by immunohistochemical technique in each group ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

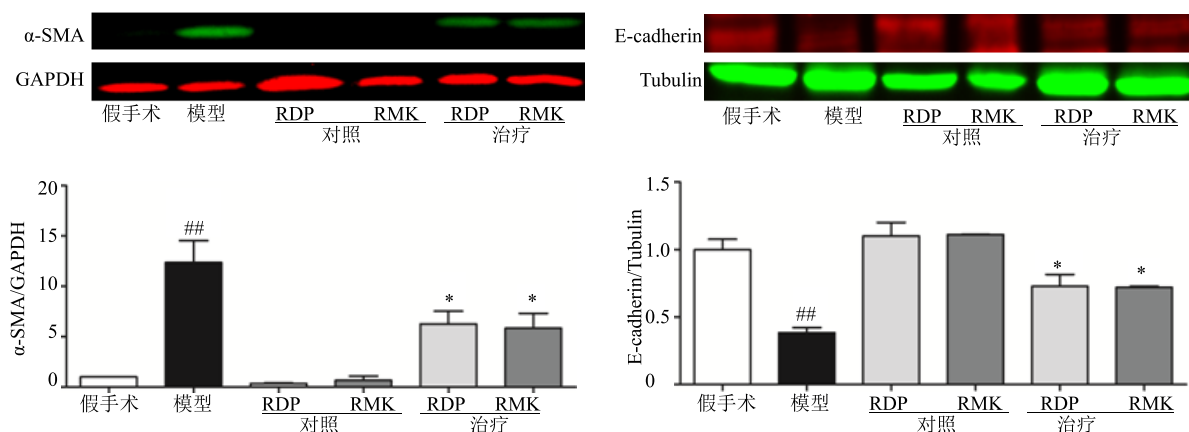


图 5 各组小鼠肾组织中 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Protein expression of α -SMA and E-cadherin in kidney tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达；与假手术组相比，模型组小鼠肾组织中 E-cadherin 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，RDP 及 RMK 治疗组小鼠肾组织中 E-cadherin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。RDP 与 RMK 治疗组小鼠肾组织中 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白表达水平无明显差异。

3.3 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)

将小鼠肾脏病理评分数据，包括包膜下病变，肾盂扩张，乳头坏死，肾小管管腔扩大、萎缩、变性、管型，肾间质炎症、纤维增生等导入 SIMCA-P13.0 软件，采用 PLS-DA 对 RDP 和 RMK 治疗组小鼠肾脏病理评分指标进行综合分析。由图 6 可知，在 RDP 和 RMK 治疗组的 PLS-DA 得分图中 RDP 和 RMK 治疗组的分群不明显，而且 $Q^2 < 0$ ，说明其为过拟合状态，即假设不合理，因此认为 RDP 和 RMK 改善 UUO 诱导肾脏组织纤维化的作用无明显差异。

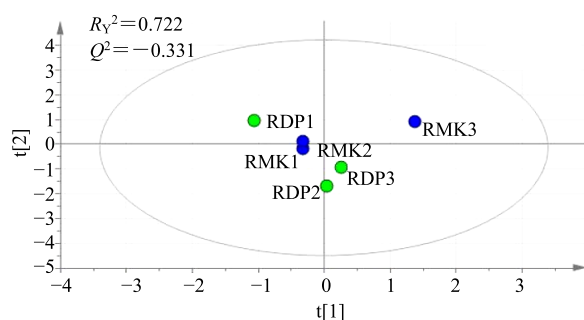


图 6 RDP 和 RMK 治疗组小鼠肾脏病理评分指标 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA score of pathological section of kidney of mice in RDP and RMK treatment

4 讨论

肾纤维化是各种病理因素引发的慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 进展至终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 的共同病理特征，在肾脏疾病的进展中发挥着重要的作用^[15]。目前能够应用于临床的抗纤维化药物仍然匮乏，因此，寻求治疗肾纤维化的有效药物仍然是研究人员需要攻克的难题。本研究在课题组前期研究的基础上，进一步比较了 RMK 与 RDP 的抗肾纤维化活性，以期为 RMK 的应用开发提供参考依据，也为从天然药物中寻找和发现抗肾纤维化的药物积累工作基础。

TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞纤维化模型是评价药物抗肾纤维化作用最常用的细胞模型^[16]。正常的 HK-2 细胞形态呈椭圆形铺路石样，当给予 TGF- β 1 刺激后，细胞变长成为梭形，细胞长度宽度比值明显增大。本实验采用 TGF- β 1 诱导的 HK-2 模型，以细胞形态、细胞长度与宽度比值为主要观测指标，比较了 RMK 与 RDP 对细胞形态的影响。研究结果显示，RDP 提取物 (1.5、5、15 μ g/mL) 与 RMK 提取物 (3、10 μ g/mL) 均可以有效改善 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞形态改变，减小细胞长度与宽度比值。提示 RMK 和 RDP 对 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞纤维化均具有明显的保护作用，且两者体外药效无明显差异。

UUO 诱导的肾纤维化模型是国际公认的肾间质纤维化模型^[17]。肾纤维化的病理机制目前不完全清楚，但是上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肾纤维化发生发展的重要步骤

之一^[18]。E-cadherin 是上皮细胞的标志物,对于维持上皮黏附性极为重要,而细胞表型转化为肌成纤维细胞后,大量表达 α -SMA,两者为肾纤维化评价的常用指标^[19-20]。本实验采用 UUO 诱导的小鼠肾纤维化模型,综合运用免疫印迹、免疫组化、HE 染色、Masson 染色等方法,以肾脏组织病理,肾脏组织中 α -SMA、E-cadherin 的蛋白表达等为主要观测指标,比较 RDP 和 RMK 对各项指标的影响。研究结果显示,RDP (40 mg/kg) 与 RMK (80 mg/kg) 均能显著降低 UUO 模型小鼠 α -SMA 和增加 E-cadherin 的蛋白表达,并减轻病理性损伤和纤维化程度,且两者体内药效无明显差异。RDP 作为蒙古民间常用药材,对于泌尿系统疾病具有良好的治疗作用。但是 RDP 在中国境内资源有限,药材来源相对困难,因此选取 RDP 的同属植物 RMK 进行肾损伤保护作用的药效比较,以期解决药材资源问题并为 RMK 的开发应用提供研究基础。实验室前期对 RDP 和 RMK 抑制 UUO 引起肾纤维化的剂量进行考察,发现 40 mg/kg 为 RDP 的最佳剂量,而 80 mg/kg 为 RMK 的最优剂量,因此本研究采用二者的最优剂量进行抑制纤维化的药效比较,结果表明二者药效相当,说明 RMK 可用作 RDP 的替代药材进行肾保护作用的研究和开发。在本研究中,RDP 和 RMK 对照组与假手术组没有显著性差异,表明 40 mg/kg RDP 和 80 mg/kg RMK 为安全剂量。在后续的研究中,将进一步开展 RMK 的毒性研究,为其成为治疗肾脏相关疾病的 RDP 替代药材提供可靠的实验依据。

PLS-DA 是一种用于判别分析的多变量统计分析方法^[21]。在药物分析中常用于主成分分析,也可用于药物之间的药效学差异分析^[22]。本研究采用 PLS-DA 对 RDP 和 RMK 组小鼠肾脏病理评分进行分析,结果进一步表明,RDP 和 RMK 体内抗肾纤维化药效无显著差异。

综上所述,RDP 和 RMK 对 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞模型和 UUO 诱导的肾纤维化小鼠模型均具有保护作用,两者在改善一般效应指标方面无显著差异,提示二者均具有抗肾纤维化作用。本研究为 RMK 成为 RDP 替代药材的可行性提供了理论支撑,为 RMK 的进一步深入研究积累了工作基础,也为从天然药物中发现抗肾纤维化的药物提供了参考依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 35 卷,第 1 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 刘玉梅,孙振国. 东北茶藨子的分布调查 [J]. 林业勘查设计, 2006(3): 71-73.
- [3] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志 (第 3 卷) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2000.
- [4] Ligaa U, Davaasuren B, Ninjil N. *Medicinal Plants of Mongolia Used in Western and Eastern Medicine* [M]. Ulaanbaatar: JKC Printing, 2006.
- [5] 韦睿,黄艳,王晓红,等. 东北茶藨子研究现状及开发前景展望 [J]. 北方园艺, 2016(14): 202-206.
- [6] 田贺,张志东,李亚东,等. 茶藨属植物果实营养成分分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 621-623.
- [7] 周霞. 大黄、茶藨子等中草药活性成分的提取分离及生物活性研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2006.
- [8] 贾健辉,张彦丽,宋宏光. 山药东北茶藨子复合饮料的研制 [J]. 保鲜与加工, 2012, 12(1): 36-38.
- [9] 李国强,刘跃杰,蒲文征. 浅谈东北茶藨子的应用价值及发展建议 [J]. 中国林副特产, 2013(2): 93-94.
- [10] Gu L, Wang Y, Yang G, et al. *Ribes diacanthum* Pall (RDP) ameliorates UUO-induced renal fibrosis via both canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231: 302-310.
- [11] 周宝萍,张春磊,邹筱涵,等. 楔叶茶藨地上部分化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(22): 23-27.
- [12] 李彦,周宝萍,张皖晋,等. 东北茶藨子化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 772-779.
- [13] Tilyek A, Chai C, Hou X, et al. The protective effects of *Ribes diacanthum* Pall on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178(B11): 297-306.
- [14] Chevalier R L, Forbes M S, Thornhill B A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2009, 75(11): 1145-1152.
- [15] Grande M T, Lopez-Novoa J M. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2009, 5(6): 319.
- [16] Meng X, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. TGF- β : The master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.

- [17] Chevalier R L, Forbes M S, Thornhill B A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2009, 75(11): 1145-1152.
- [18] Allison S J. Fibrosis: Targeting EMT to reverse renal fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(10): 565.
- [19] Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: Fact or fantasy? [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(2): 468-474.
- [20] Li Y, Yang J, Dai C, *et al.* Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(4): 503-516.
- [21] De Lucia Jr F C, Gottfried J L. Influence of variable selection on partial least squares discriminant analysis models for explosive residue classification [J]. *Spectrochim Acta Part B: Atomic Spectros*, 2011, 66(2): 122-128.
- [22] 赵佳文, 李水清, 刘艳菊, 等. 基于抗菌活性及病理指标评价子芩与枯芩对肺炎的药效学差异 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 93-99.