

白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠的干预作用及其机制研究

印 鑫^{1,2}, 彭蕴茹^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210014

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 观察白首乌 C-21 甾苷对单侧输尿管结扎所致的大鼠肾纤维化的干预作用, 并探究其作用机制。**方法** 80 只 SD 大鼠随机选取 15 只为假手术组, 剩余大鼠进行单侧输尿管结扎制备大鼠肾纤维化模型, 将造模大鼠随机分为 4 组, 即模型组、阳性药氯沙坦钾 (20 mg/kg) 组及白首乌 C-21 甾苷高、低剂量 (400、200 mg/kg) 组, 每组 15 只。各组大鼠于造模后第 2 天起, 每天 ig 给药 1 次 (10 mL/kg), 连续给药 4 周, 假手术组与模型组大鼠 ig 给予等体积蒸馏水。干预 28 d 后, 每组取 10 只大鼠的肾组织, 采用碱水解法检测肾组织中羟脯氨酸 (Hyp) 水平, 采用 HE 和 Masson 染色检测病理损伤和纤维化程度, 通过免疫荧光、Western blotting 法检测转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定肾组织中 I 型胶原蛋白 (collagen-I) 和 collagen-III mRNA 表达水平。**结果** 与模型组比较, 白首乌 C-21 甾苷能明显改善肾纤维化大鼠的病变程度, 减少炎性细胞浸润、纤维组织和胶原的增生, 可以明显降低大鼠肾脏指数, 降低肾组织中 Hyp 水平, 并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 免疫组化和 Western blotting 结果显示, 白首乌 C-21 甾苷可以明显上调大鼠肾组织 E-cadherin 的表达水平, 下调 TGF- $\beta 1$ 和 α -SMA 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01); qRT-PCR 结果显示白首乌 C-21 甾苷可显著降低大鼠肾组织 collagen-I、collagen-III mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。**结论** 白首乌 C-21 甾苷对单侧输尿管结扎的大鼠肾纤维化具有明显的干预作用, 其机制可能与抑制 collagen-I 和 collagen-III 的过度表达, 下调 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA 蛋白高表达和上调 E-cadherin 蛋白低表达有关, 通过调控肾小管上皮-间质转化, 发挥抗肾纤维化的作用。

关键词: 白首乌; C-21 甾苷; 肾纤维化; 肾小管上皮-间质转化; I 型胶原; III 型胶原

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)11-3021-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.021

Effects of total C-21 steroidal glucosides from *Cynanchum auriculatum* on renal fibrosis in rats and mechanisms involved

YIN Xin^{1,2}, PENG Yun-ru^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210014, China

2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To investigate the effects of C-21 steroidal glucosides from *Cynanchum auriculatum* on renal fibrosis in rats caused by unilateral ureteral ligation and explore its mechanisms. **Methods** A total of 15 rats were randomly chosen as sham operation group (Sham), while the remaining rats underwent unilateral ureteral ligation. The rats after the operation were randomly divided into four groups, namely the Sham operation group, the model group, the positive control group (20 mg/kg), *C. auriculatum* high group (400 mg/kg), *C. auriculatum* low group (200 mg/kg), 15 per group, and the rats in each group were administrated with corresponding drugs. After the intervention of 28 d, all the rats were sacrificed and the kidneys were then removed. The content of hydroxyproline was measured. HE and Masson staining were conducted to assess kidney pathological changes and renal fibrosis. The protein expression of TGF- $\beta 1$, α -SMA, and E-cadherin were tested with immunohistochemistry and Western blotting. The mRNA expression of collagen-I and collagen-III was evaluated using qRT-PCR. **Results** Compared with the model group, C-21 steroid glycosides significantly alleviated the kidney pathological injury and renal fibrosis, and reduced fibrous tissue and collagen proliferation.

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774178); 国家自然科学基金资助项目 (81373888); 江苏省研究生创新项目 (SJCX19-0369)

作者简介: 印 鑫, 女, 在读研究生, 研究方向中药药理学。E-mail: 947943011@qq.com

*通信作者 彭蕴茹, 女, 研究员, 主要研究方向为中药作用机制。E-mail: pengyunru@126.com

C-21 steroid glucosides from *C. auriculatum* can significantly reduce the kidney/body weight ratio and the content of hydroxyproline in kidney tissue ($P < 0.05, 0.01$), and it showed in a dose-dependent manner. Compared with the model group, the expression of α -SMA and TGF- β 1 was decreased significantly, and the expression of E-cadherin was increased significantly ($P < 0.05, 0.01$) in *C. auriculatum* group. Moreover, compared with the model group, C-21 steroidal glucosides significantly down-regulated the mRNA expression of collagen-I and collagen-III mRNA ($P < 0.01$). **Conclusion** C-21 steroid glycosides from *C. auriculatum* can effectively attenuate renal fibrosis in rats with unilateral ureteral ligation and its underlying mechanisms may be related to inhibiting the over-expression of collagen-I and collagen-III, down-regulating the expression of α -SMA and TGF- β 1, and up-regulating the expression of E-cadherin. By regulating the tubular epithelial-mesenchymal transition, it exerts its anti-fibrotic effect.

Key words: *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; total C-21 steroidal glucosides; renal fibrosis; renal tubular epithelial-mesenchymal transition; collagen I; collagen III

肾纤维化是指肾脏在各种致病因素如炎症、损伤等作用下的病理修复反应,其实质是成纤维细胞的增殖、细胞外基质的过度积聚及肾功能进行性的下降^[1-3]。肾纤维化是多种慢性肾脏疾病的主要病理改变,是最终导致终末期肾衰竭的共同通路。目前尚无治疗肾纤维化的特效药,多采用激素、干扰素、血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)等抗纤维化,但疗效尚不理想。

白首乌系萝藦科(Asclepiadaceae)鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight、隔山牛皮消 *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl. 及泰山白首乌(戟叶牛皮消) *C. bungei* Decne. 等植物的块根。历史上其作为补益性中药,有养血益肝、固肾益精、强筋健骨、乌黑须发及延年益寿等功效^[4]。关于白首乌的近代研究主要集中在抗肿瘤、抗衰老、增强免疫、保护肝脏等方面^[5-7]。近年有报道称白首乌总苷有明显的抗肝纤维化作用,作用机制与其抗脂质过氧化作用密切相关^[8-9],同时本课题组前期研究也证明,白首乌 C-21 甾苷有显著的抗肝纤维化的作用^[10-11]。但到目前为止,白首乌在防治肾纤维化方面的机制研究尚未见报道,本研究观察白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠的干预作用,并进一步探究白首乌 C-21 甾苷防治肾纤维化的可能作用靶点和途径。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠,80 只,体质量(150~180) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXK(沪)2017-0005。所有大鼠分笼饲养,每笼 5 只,饲以标准合成饲料,自由饮水摄食,动物房温度为 17~25 °C,光照 12 h,湿度 50%~60%。在实验前,所有大鼠适应性饲养 1 周。

1.2 药物与试剂

白首乌药材产自江苏滨海去皮的耳叶牛皮消块

根,由江苏省中医药研究院钱仕辉教授鉴定其为萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的块根;氯沙坦钾(批号 14090402,扬子江药业集团四川海蓉药业有限公司);羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏凯基生物科技股份有限公司);广谱蛋白 Marker、山羊抗兔 IgG、Western blotting 一抗稀释液、特超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究);抗小鼠 IgG (Biosharp 公司); β -actin 兔单抗、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)兔单抗(Cell Signaling 公司);转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(Abcam 公司);QuantiNova Rev. Transcription 试剂盒、QuantiNova SYBR Green PCR 试剂盒(Qiagen 公司);I 型胶原蛋白(collagen-I)、collagen-III 引物(金斯瑞生物科技有限公司)。

1.3 仪器

高速低温离心机(美国 Beckman 公司);BT125D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);水平摇床(北京市六一仪器厂);Primovert 倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司);天能 5200 凝胶成像系统(上海 Tanon 公司);蛋白电泳与转移仪(美国 Bio-Rad 公司);实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)系统(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 白首乌 C-21 甾苷提取物制备

取 500 g 白首乌的干燥块根,粉碎后用体积比为 1:10 的 95%乙醇溶液热回流提取 2 次,每次 2 h,滤过。收集残渣以 60%乙醇(1:10)热回流提取 2 h,分别萃取得到相应部位,合并 3 次滤液,再通过减压浓缩得浸膏。随后加入双蒸水使其分散,依次用氯仿、醋酸乙酯萃取,减压回收溶剂,合并氯仿、醋酸乙酯部位,即得白首乌 C-21 甾苷

提取物^[10], 经比色法测定 C-21 甾体总苷的质量分数为 52.89%。

2.2 模型制备、分组与给药

80 只大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉 (3 mL/kg) 后固定于操作台上, 剪毛后用碘酒、75%酒精消毒手术区, 行左侧腹肾区切口, 用眼科镊分离左侧输尿管, 用 5 号手术线结扎 2 道, 上一道结扎点位于左肾下极水平, 然后在 2 道结扎点间剪断输尿管, 逐层缝合腹膜、肌肉和皮肤。术中严格遵守无菌操作。假手术组大鼠仅游离左侧输尿管, 但不结扎, 其余操作同模型组^[12]。

除去手术过程中死亡大鼠, 15 只大鼠为假手术组, 剩余 60 只模型大鼠随机分为 4 组, 即模型组、阳性药氯沙坦钾组 (20 mg/kg)、白首乌 C-21 甾体高剂量 (400 mg/kg, 相当于生药量 4 g/kg)、低剂量 (200 mg/kg) 组^[11], 每组 15 只。造模后第 2 天起, 每天 ig 给药 1 次, 给药体积 10 mL/kg, 连续给药 4 周。假手术组与模型组大鼠给予等体积蒸馏水。给药 28 d 后, 末次给药 24 h 后处死大鼠, 每组随机取 10 只大鼠进行指标检测。

2.3 脏器指数和肾组织 Hyp 水平检测

取大鼠肾脏, 称质量, 计算脏器指数 (脏器指数 = 肾脏质量/体质量)。称取肾脏 50~100 mg, 根据 Hyp 检测试剂盒说明书, 采用碱水解法测定肾组织中 Hyp 水平。

2.4 HE 和 Masson 染色观察肾组织病理变化

将固定在 10%福尔马林中的大鼠肾组织进行脱水、包埋, 并切成 4 μ m 切片。对切片组织采用 HE 和 Masson 染色, 显微镜下观察肾组织结构变化。由 2 位独立的病理学实验人员根据肾损伤分级量表 (1~4, 无伤害~严重伤害) 对病理切片进行损伤评价^[13]。

2.5 免疫组织化学法检测肾脏中 α -SMA、TGF- β 1 和 E-cadherin 蛋白的表达

大鼠肾组织石蜡包埋切片脱蜡水化、抗原修复、阻断内源过氧化氢酶活性后, 将载玻片与抗体 TGF- β 1 (1:500)、 α -SMA (1:1000) 和 E-cadherin (1:1000) 一起温育, 随后加入二抗, DAB 显色后, 将切片用苏木精复染。随机选取 5 个区域, 在 200 倍镜下对大鼠肾脏标本中的阳性细胞进行计数。使用 Image-Pro Plus 6.0 (美国 Media Cybernetics Inc. 公司) 测定阳性面积, 由对治疗不知情的病理学实验人员进行图像分析。

2.6 Western blotting 检测肾脏中 α -SMA、TGF- β 1 和 E-cadherin 的表达

采用 500 μ L RIPA 裂解缓冲液 (含有 1 mmol/L PMSF) 在冰上对肾组织进行匀浆处理, 收集组织裂解物, 以 10 000 r/min 离心 5 min 提取蛋白。使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定上清液的蛋白质含量。通过 8%或 10% SDS-PAGE 分离等量的蛋白质 (40 μ g) 并转移至 PVDF 膜。用 5%脱脂乳封闭 1 h 后, 将膜在 4 $^{\circ}$ C 下与多克隆抗 TGF- β 1 (1:500)、 α -SMA (1:1000)、E-cadherin (1:1000) 一起温育过夜。第 2 天, 洗涤 3 次后, 将膜与山羊抗兔 IgG (1:4000) 或抗小鼠 IgG (1:4000) 在室温温育 1 h。使用 ECL 显影液对蛋白条带进行显色, 在成像仪中进行图像扫描、拍照。使用 Tanon-5200 Annlyzer 软件定量每个条带的灰度值, 以内参蛋白 β -actin 均一化, 表示目的蛋白的相对表达量。

2.7 RNA 提取和 qRT-PCR 检测肾组织中 collagen I 和 collagen III RNA 的表达

使用 Trizol 试剂从大鼠的冷冻肝组织中提取总 RNA, 根据 QuantiNova Rev. Transcription 试剂盒说明书操作, 逆转录成 cDNA。使用 Primer 5.0 软件设计基因特异性引物序列, collagen-I 引物上游序列: 5'-CTGCTGGTCCTAAGGGAGAG-3', 下游序列: 5'-GACAGCACCATCGTTACCAC-3'; collagen-III 引物上游序列: 5'-TCCTGGATACCAAGGTCCTC-3', 下游序列: 5'-GACCAATAGCACCAGGAGGT-3'。根据 QuantiNova SYBR Green PCR 试剂盒操作说明进行 RNA 定量分析。GAPDH 作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较方法分析相对 mRNA 的水平。

2.8 统计学处理

采用软件 SPSS 20.0 进行数据处理以及统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据符合正态分布和方差齐性采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 白首乌 C-21 甾体对肾纤维化大鼠肾脏指数及 Hyp 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠肾脏指数显著升高 ($P<0.01$), 肾脏组织中 Hyp 水平显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 白首乌 C-21 甾体高、低剂量组和阳性药氯沙坦钾组大鼠肾脏指数显著降低 ($P<0.01$), 肾脏组织水肿改善, 肾脏组织中 Hyp 水平显著降低 ($P<0.01$)。见表 1。

3.2 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠肾组织形态学改变和纤维化程度的影响

HE 染色切片显微镜下观察, 假手术组大鼠肾组织单位结构清晰, 肾小球囊无扩张或缩小, 肾小管上皮细胞无明显变性坏死, 管腔内无脱落上皮

表 1 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化模型大鼠肾脏指数及 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of C-21 steroidal glucosides from *C. auriculatum* on renal index and level of Hyp of renal fibrosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肾脏指数	Hyp/(μg·g ⁻¹)
假手术	—	0.749±0.059	201.3±55.4
模型	—	1.509±0.180**	722.1±121.3**
氯沙坦钾	20	1.134±0.213##	552.2±85.6##
白首乌 C-21	200	1.106±0.197##	524.1±106.3##
甾苷	400	1.086±0.180##	458.9±96.6##

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

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

细胞或管型, 间质中无血管扩张或炎细胞浸润。模型组大鼠肾盂高度扩张, 肾小管明显扩张, 肾间质有广泛的炎性细胞浸润, 纤维组织增生明显。白首乌 C-21 甾苷可明显降低大鼠的病变程度, 减少炎性细胞浸润及纤维组织增生。

利用 Masson 染色观察大鼠肾脏组织胶原增生情况。显微镜下观察, 假手术组大鼠肾脏组织为红色, 仅肾小管基底有纤薄的纤维组织; 模型组大鼠肾组织红色染色较少, 胶原增生区域较大, 表明在病灶局部胶原结缔组织增生, 发生纤维化。白首乌 C-21 甾苷可明显减少大鼠肾组织胶原增生, 见表 2 和图 1。

3.3 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠肾组织 TGF-β1、α-SMA 和 E-cadherin 蛋白表达水平的影响

免疫组织化学分析显示, 假手术组大鼠肾组织中几乎观察不到 TGF-β1 阳性细胞, 而模型组大鼠肾组织中 TGF-β1 阳性细胞的数量显著增加 ($P < 0.01$)。

表 2 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化模型大鼠肾脏病理学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of C-21 steroidal glucosides from *C. auriculatum* on pathological examination of renal fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评分		
		胶原增生	肾小管坏死	炎性渗出
假手术	—	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
模型	—	3.5±0.7**	3.8±0.6**	2.8±0.5**
氯沙坦钾	20	1.6±0.5##	1.5±0.6##	1.3±1.0##
白首乌 C-21 甾苷	200	2.0±0.6##	1.9±0.5##	1.6±1.1#
	400	1.8±0.5##	1.5±0.9##	1.2±0.8##

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

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

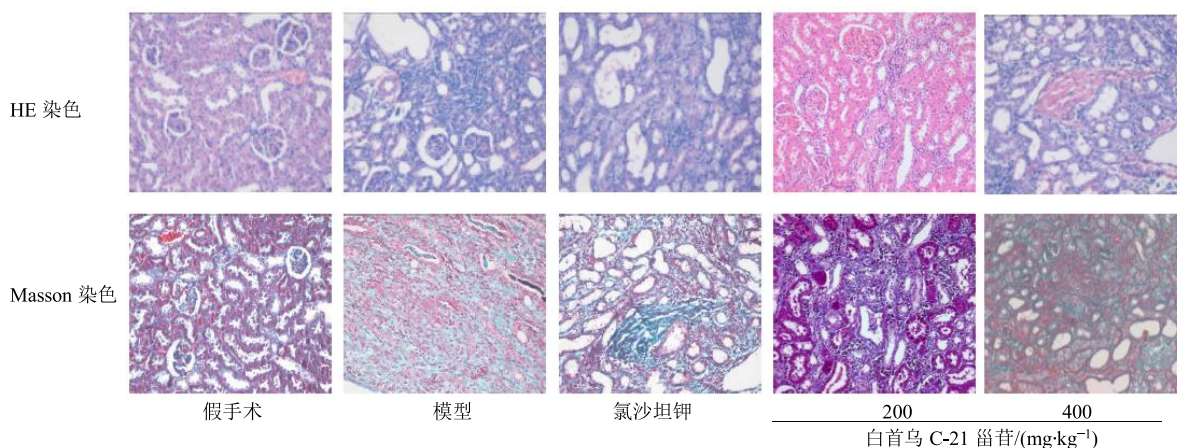


图 1 各组大鼠肾脏病理学形态变化和纤维化程度 (×200)

Fig. 1 Pathological morphological changes and degree of fibrosis of rats in each group (×200)

假手术组大鼠肾组织中 α -SMA 的阳性染色主要分布在肾脏的血管平滑肌细胞中, 而模型组大鼠肾脏 α -SMA 的阳性细胞的表达量显著增加 ($P<0.01$)。假手术组大鼠肾组织中 E-cadherin 主要分布在肾上皮间质中, 模型组大鼠肾组织中 E-cadherin 阳性细胞明显减少 ($P<0.05$)。与模型组比较, 白首乌 C-21 甾苷低、高剂量组大鼠肾组织 TGF- β 1 和 α -SMA 阳性细胞均显著减少 ($P<0.05$ 、 0.01), 而 E-cadherin 阳性细胞均显著增加 ($P<0.05$), 见图 2 和表 3。

Western blotting 结果表明, 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织中 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$), 而 E-cadherin 表达水平显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 白首乌 C-21

甾苷高、低剂量组大鼠肾组织 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 而 E-cadherin 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$), 见图 3。

3.4 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠肾组织 collagen-I 和 collagen-III mRNA 表达的影响

collagen-I 和 collagen-III 是脏器纤维化的标志物, 其表达量的增加是判断纤维化的主要依据。qRT-PCR 结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织中 collagen-I、collagen-III mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 白首乌 C-21 甾苷低、高剂量组大鼠肾组织 collagen-I、collagen-III mRNA 水平显著下调 ($P<0.01$)。见图 4。

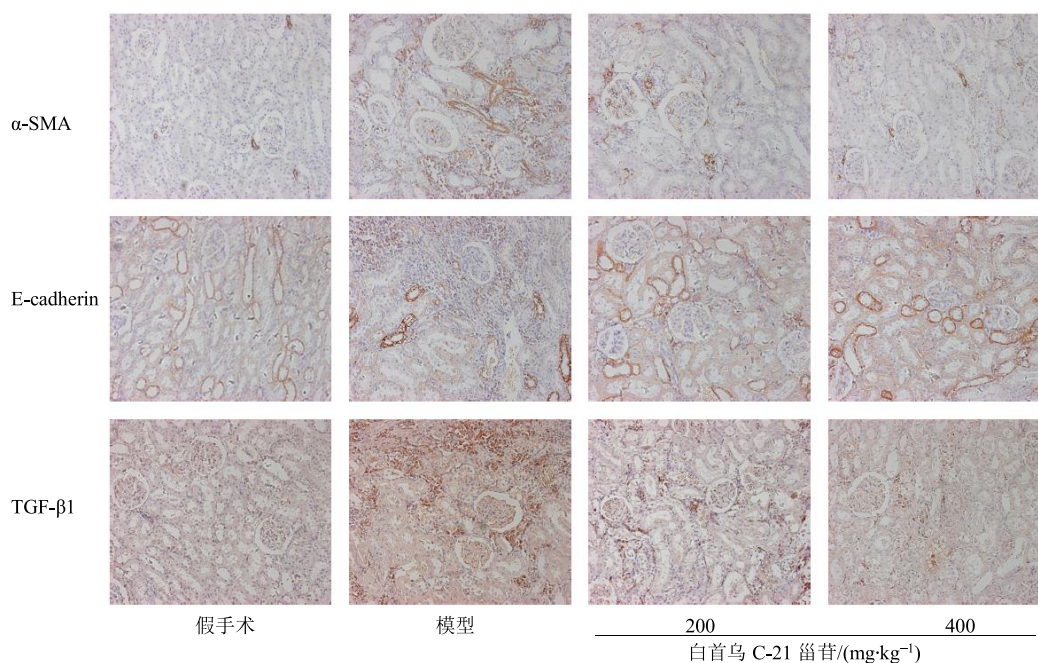


图 2 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠肾组织 TGF- β 1、 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白表达水平的影响 (免疫组化, $\times 200$)

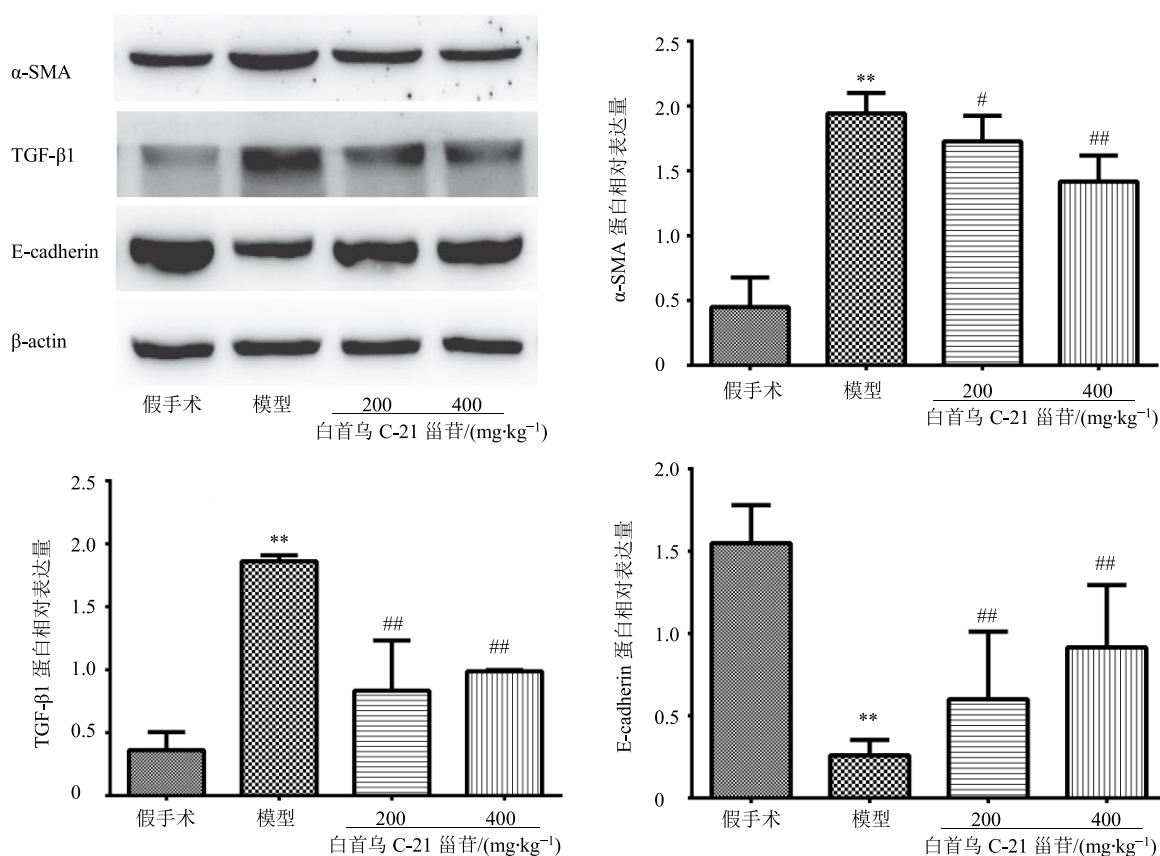
Fig. 2 Effect of C-21 steroidal glucosides from *C. auriculatum* on protein expression of TGF- β , α -SMA and E-cadherin in renal of renal fibrosis rats (immunohistochemical analysis, $\times 200$)

表 3 白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化大鼠肾组织 TGF- β 1、 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白表达水平的影响 (免疫组化, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 3 Effect of C-21 steroidal glucosides from *C. auriculatum* on protein expression of TGF- β , α -SMA and E-cadherin in renal of renal fibrosis rats (immunohistochemical analysis, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		TGF- β 1	α -SMA	E-cadherin
假手术	—	8.18 $\pm$ 1.51	11.49 $\pm$ 0.55	16.93 $\pm$ 3.61
模型	—	16.78 $\pm$ 1.52**	19.66 $\pm$ 2.64**	9.32 $\pm$ 0.80*
白首乌 C-21 甾苷	200	11.36 $\pm$ 2.21 [#]	14.60 $\pm$ 1.61 [#]	14.84 $\pm$ 2.70 [#]
	400	10.88 $\pm$ 0.75 ^{##}	13.20 $\pm$ 1.49 [#]	13.64 $\pm$ 1.50 [#]

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 4 同
 ** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as figure 4

图 3 白首乌 C-21 甾体苷对肾纤维化大鼠肾组织 TGF- β 1、 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白表达水平的影响 (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of C-21 steroidal glucosides from *C. auriculatum* on protein expression of TGF- β , α -SMA and E-cadherin in renal of renal fibrosis rats (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

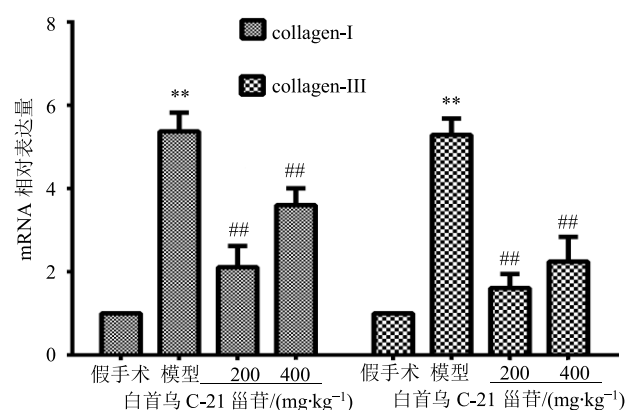


图 4 白首乌 C-21 甾体苷对肾纤维化大鼠肾组织 collagen-I 和 collagen-III mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Effect of C-21 steroidal glucosides from *C. auriculatum* on mRNA expression of collagen-I and collagen-III in renal of renal fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

C-21 甾体类化合物是从白首乌中提取出来数量最多的化学成分,也是目前公认的白首乌中主要的活性成分^[8-11]。目前白首乌中 C-21 甾体类化合物的药理活性主要为抗肿瘤、保肝、免疫调节、抗自由基损伤等。肾纤维化多由原发性肾小球疾病、慢性肾盂肾炎、糖尿病肾病等引发,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,其中肾小管上皮-间质转化(EMT)被认为是导致肾纤维化的主要因素之一^[14-15]。EMT 能够促进结缔组织蛋白的过度合成和沉积,进而导致细胞外基质(ECM)的过度生成,引发肾纤维化。目前尚未发现能有效减缓肾纤维化进程并维持肾功能的药物。

本实验通过制备输尿管梗阻性大鼠肾纤维化模型探讨白首乌 C-21 甾苷对肾纤维化的干预作用及潜在的作用机制。本研究结果表明,造模后大鼠肾脏体积明显增大,肾脏内多积水,肾小管明显扩张,肾间质有广泛的炎性细胞浸润,纤维组织增生明显。白首乌 C-21 甾苷能够显著减小大鼠肾脏体积,降低肾组织中 Hyp 水平,病理结果显示白首乌 C-21 甾苷可减轻模型大鼠的病变程度,减少炎性细胞浸润及纤维组织增生。该结果提示白首乌 C-21 甾苷具有明显的抗肾纤维化作用。

肾纤维化是一种复杂而动态的过程,各种连续的慢性刺激会导致肾小管上皮细胞募集炎性细胞释放大量的炎症因子和纤维化细胞因子引发炎症反应,诱导肾小管上皮-间质转化,引起肌成纤维细胞积聚,导致 ECM 沉积^[3,16]。Collagen-I 和 collagen-III 是 ECM 的重要组成部分,其异常高表达会导致 ECM 的合成大于降解,加快肾纤维化的进程^[17-19]。TGF- β 1 是目前所知作用最为明显的促纤维化细胞因子, α -SMA 和 E-cadherin 则分别是肾间质和肾上皮的特征标记物^[20-22]。本实验验证了白首乌 C-21 甾苷能下调 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白的高表达,上调 E-cadherin 蛋白的低表达,同时能抑制肾组织中 collagen-I、collagen-III mRNA 的表达。这说明白首乌 C-21 甾苷是通过抑制肾小管上皮细胞 EMT,保持细胞外基质合成和降解的平衡,从而干预肾纤维化的进程。

综上所述,白首乌 C-21 甾苷对单侧输尿管结扎的大鼠肾纤维化具有明显的干预作用,其机制可能与抑制 collagen-I、collagen-III mRNA 的过度表达,下调 TGF- β 1、 α -SMA 蛋白高表达和上调 E-cadherin 蛋白低表达有关,通过调控肾小管 EMT 过程,发挥抗肾纤维化的作用。但白首乌 C-21 甾苷对肾小管上皮细胞转化的确切作用尚需验证,同时其机制的探讨还需要深入研究。

参考文献

- [1] Ma H B, Lee S, Yang Y, *et al.* Pentoxifylline protects against loss of function and renal interstitial fibrosis in chronic experimental partial ureteral obstruction [J]. *Pathophysiology*, 2018, doi: 10.1016/j.pathophys.2018.08.004.
- [2] Wing M R, Ramezani A, Gill H S, *et al.* Epigenetics of progression of chronic kidney disease: Fact or fantasy? [J]. *Semin Nephrol*, 2013, 33(4): 363-374.

- [3] 吉 晶,何立群. 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾功能及肾组织 ECM 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 63-68.
- [4] 彭蕴茹,丁永芳,李友宾,等. 白首乌研究现状 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 370-378.
- [5] 王冬艳,华 欣,叶记林,等. 江苏地产白首乌 C₂₁ 甾体苷对高血脂大鼠血脂调节和肝脏保护作用研究 [J]. 安徽医药, 2015, 19(8): 1454-1457.
- [6] 陈东伟,胡明哲,李克明,等. 泰山白首乌的药理作用和临床应用 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(54): 10666-10667.
- [7] 吕伟红,张爱香,徐 姗,等. 江苏地产白首乌总苷对大鼠肝纤维化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2508-2511.
- [8] 宋祥云,徐凯勇,李自发,等. 泰山白首乌对自然衰老小鼠抗自由基损伤及端粒酶活性的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 5(5): 458-460.
- [9] Qian X, Li B, Li P, *et al.* C₂₁ steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* and their neuroprotective effects against H₂O₂-induced damage in PC12 cells [J]. *Phytochemistry*, 2017, 4(14): 1-15.
- [10] Ding Y F, Peng Z X, Ding L. Baishouw extract suppresses the development of hepatocellular carcinoma via TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00389.
- [11] Wu Z Z, Wang Y Y, Meng X, *et al.* Total C-21 steroidal glycosides, isolated from the root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative injury and inflammation in L02 cells [J]. *Inter J Mol Med*, 2018, 42(10): 3157-3170.
- [12] 王亚辉,郑路照,程锦国. 肾病 I 号方总皂苷对单侧输尿管结扎大鼠肾纤维化的影响 [J]. 陕西中医药大学学报, 2016, 39(6): 114-116.
- [13] 郭 莉,龚幼兰,李 晶,等. 莱菔硫烷对单侧输尿管梗阻所致小鼠肾纤维化的干预作用及其机制 [J]. 山东医药, 2019, 59(32): 33-36.
- [14] Yoshida K, Nakashima A, Doi S, *et al.* Serum-free medium enhances the immunosuppressive and antifibrotic abilities of mesenchymal stem cells utilized in experimental renal fibrosis [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2018, doi: 10.1002/sctm.17-0284.
- [15] Grande M T, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, *et al.* Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease [J]. *Nat Med*, 2015, doi: 10.1038/nm.3901.
- [16] Wei Z B, Caty J, Whitson J, *et al.* Reduced Glutathione level promotes epithelial-mesenchymal transition in lens

- epithelial cells via a Wnt/ β -Catenin-mediated pathway: Relevance for cataract therapy [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(11): 7-18.
- [17] 陈建, 曾莉, 陈刚, 等. 抗纤灵方对 AngII 诱导肾纤维化小鼠肾组织 α -SMA 和 I 型胶原的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 739-742.
- [18] 王高强, 米秀华, 沈丽萍, 等. 实脾固肾化瘀方对阿霉素肾纤维化大鼠肾组织 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 疑难病杂志, 2017, 16(9): 927-930.
- [19] 彭祥梅. 在肾小管上皮细胞中, AG1478 对 TGF- β 1 诱导 EMT 发生的影响与机制的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [20] 贾利宁, 马晓桃, 杨阳, 等. Sorafenib 通过抑制 TGF- β /Smad 途径延缓肾纤维化的研究 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2016, 37(3): 378-382.
- [21] O'Connor J W, Mistry K, Detweiler D, *et al.* Cell-cell contact and matrix adhesion promote α SMA expression during TGF β 1-induced epithelial-myofibroblast transition via Notch and MRTF-A [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 26226.
- [22] 江燕. E-cadherin 和 α -SMA 基因的表观调控在肾间质纤维化中作用的研究 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2012.