

云南灯盏花胶囊对慢性肾衰竭大鼠 CTGF 及 Smad 7 mRNA 表达影响的研究

杜义斌 李琦 张坤扬 段艳蕊 吴晓 谢楚侨 刘明星 潘承政

【摘要】 目的 通过观察云南灯盏花胶囊对 5/6 肾切除慢性肾衰竭大鼠结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、Smad7 蛋白表达的影响,探讨云南灯盏花胶囊减轻肾纤维化以延缓慢性肾衰竭的作用机制。方法 采用 5/6 肾切除法造模,观察实验大鼠治疗后的一般状态。检测血肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)摘取残肾组织,RT-PCR 检测肾组织 CTGF 的表达,蛋白质印迹技术(Western Blot)法检测肾组织内 Smad7 mRNA 的表达。结果 云南灯盏花胶囊组慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)大鼠 BUN、Scr 下降,肾组织 CTGF 表达减弱,Smad7 mRNA 表达增强,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 云南灯盏花胶囊可明显改善 5/6 肾切除 CRF 大鼠肾功能,升高 Smad7 mRNA 表达,减少肾纤维化因子 CTGF 表达,延缓慢性肾衰竭进展。

【关键词】 云南灯盏花胶囊; 慢性肾衰竭; 结缔组织生长因子; 实验研究

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.09.002

Yunnan Erigeron breviscapus capsules on expression of CTGF and Smad7 mRNA in rats with chronic renal failure: an experimental study DU Yi-bin, LI Qi, ZHANG Kun-yang, et al. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China

Corresponding author: DU Yi-bin, E-mail: dybys@126.com

【Abstract】 Objective By observing the Yunnan Breviscapine capsules on 5/6 nephrectomy chronic renal failure rats the influence of connective tissue growth factor(CTGF), Smad7 protein expression, discuss the mechanism of Yunnan Breviscapine capsules on relieving renal fibrosis to delay the chronic renal failure. **Methods** 5/6 renal resection method is adopted to build mould, observe the experimental rats' general status after treatment. Serum creatinine, and blood urea nitrogen are detected, and residual kidney tissues are picked, RT-PCR is used to detect renal tissue CTGF expression, and Protein imprinting technology(Western Blot) is used to detect renal tissues Smad7 mRNA expression. **Results** The BUN and Scr Decreased in Yunnan Breviscapine capsules group of chronic renal failure rats. CTGF express abate of Kidney tissue, Smad7 mRNA Express to enhance of Kidney tissue, Compared with model group, difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** Yunnan Breviscapine capsules can obviously improve the 5/6 nephrectomy CRF rats' renal function, elevate Smad7 mRNA expression, reduce renal fibrosis factor CTGF expression, and delay chronic renal failure.

【Key words】 Yunnan Breviscapine capsules; Chronic renal failure; Connective tissue growth factor; Experiment research

研究表明,慢性肾衰竭(chronic renal failure,

CRF)的病理基础是进行性肾小球硬化,肾小管萎缩最终导致肾脏纤维化。现已证实,多种细胞因子如结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、Smad7 蛋白等在肾脏纤维化过程中发挥着重要作用。前期研究发现,云南灯盏花胶囊可以减轻 CRF 大鼠纤维连接蛋白的表达、减轻肾间质纤维化、改善肾功能。本研究旨在通过观察云南灯盏花

基金项目:云南省自然科学基金面上项目(2010ZC194)

作者单位:650021 昆明,云南中医学院临床医学院

作者简介:杜义斌(1968-),本科,硕士生导师,主任医师。研究方向:老年肾脏病防治。E-mail:dybys@126.com

通信作者:李琦(1960-),本科,硕士生导师,主任医师。研究方向:中西医结合防治肾脏病。E-mail:liqi002@126.com

胶囊对 5/6 肾切除慢性肾衰竭大鼠 CTGF、Smad7 蛋白表达的影响,探讨云南灯盏花胶囊减轻肾脏纤维化以延缓慢性肾衰竭的作用机制,为临床防治 CRF 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体重 170 ~ 180 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.2 实验药物

云南灯盏花胶囊(由云南灯盏花 20 g、黄芪 30 g、党参 15 g、山药 20 g、炒苍术 15 g、薏苡仁 20 g、制大黄 10 g、炒杜仲 15 g、淫羊藿 15 g、千张纸 10 g 组成。胶囊 0.25 g/粒,云南省中医院制剂中心为临床试验制作),盐酸苯那普利片(即洛丁新,10 mg/片,瑞士诺华制药有限公司制造,生产批号:xl833)。

1.3 模型制备及分组

在 60 只大鼠中按随机数字表法抽取 45 只大鼠,采用 platt 5/6 肾切除方法^[1]制作慢性肾衰竭模型。模型制备以 3% 戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 腹腔麻醉后,常规消毒,切口,暴露左肾,切除左肾 2/3,主要切除皮质,止血片刻,复位肾脏,缝合。1 周后以同样方式切除整个右肾。于造模后 2 周(治疗前)将所有大鼠置于代谢笼中(禁食,不禁水),收集 24 小时尿液测尿液,检测 24 小时尿蛋白;同时采用眶底静脉丛取血 0.8 ~ 1 ml,检测血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)。在正常组随机取 1 只大鼠、造模组随机取 3 只大鼠处死,迅速剖腹取残余左肾,剥离肾包膜,取部分肾组织于 10% 中性福尔马林固定,脱水、透明、石蜡包埋,切片(厚度 3 μm),HE 染色,观察肾小球和肾小管间质变化,结合 Scr、BUN 数值证实 CRF 大鼠模型制作成功。造模过程中,正常组大鼠死亡 1 只,剩 13 只。造模组观察喂养 4 周后,死亡 3 只。将造模组大鼠平均分为模型组、灯盏花组、盐酸苯那普利组,每组 13 只。

1.4 实验方法

灯盏花组予云南灯盏花胶囊混悬液 3 g/(kg·d) 混匀于 3ml 蒸馏水中灌胃,盐酸苯那普利组予盐酸苯那普利片混悬液 10 mg/(kg·d) 混匀于 3 ml 蒸馏水中灌胃,正常组和模型组予等容积蒸馏水灌胃。各组均每天灌药 1 次,连续灌药 12 周,灌药期间自由摄食及饮水。

1.5 检测指标及方法

分组治疗给药 12 周末,同前方法检测大鼠 24 小时尿蛋白定量;大鼠腹主动脉取血,贮存于非抗凝试管中,静置 20 分钟,离心(3000 r/min,10 分钟),分别检测血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)。处死大鼠,摘取残余左肾,液氮保存,送至 -80℃ 冰箱保存用于 PCR、Western Blot 检测 CTGF、Smad7。

1.6 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。各项检测指标的数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。多组均数间比较用 *F* 检验,组间两组对比用 *q* 检验。均以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 一般情况

分组治疗过程中,正常组大鼠状态良好,皮毛整齐有光泽,生长及摄食情况无明显异常,体重增加,正常组大鼠无死亡,剩 13 只。造模组大鼠精神萎靡,食量减少,皮毛枯黄稀疏。模型组大鼠死亡 3 只,剩 10 只,灯盏花组大鼠死亡 1 只,剩 12 只,盐酸苯那普利组大鼠死亡 2 只,剩 11 只。

2.2 治疗前后大鼠血清肌酐、尿素氮和 24 小时尿蛋白定量的变化

造模后(治疗前)大鼠血 Scr、BUN 和 24 小时尿蛋白的变化:造模后(治疗前)模型组、盐酸苯那普利组、灯盏花组大鼠 Scr、Bun 值和 24 小时尿蛋白均明显高于正常组,有统计学意义(*P* < 0.01)。模型组,盐酸苯那普利组和灯盏花组之间无差异,表明造模成功,见表 1。

治疗后大鼠 Scr、BUN 和 24 小时尿蛋白变化:治疗后灯盏花组、盐酸苯那普利组大鼠血清肌酐、尿素氮浓度和 24 小时尿蛋白定量与模型组比较均降低(*P* < 0.05);治疗后灯盏花组大鼠血清肌酐、24 小时尿蛋白定量均低于盐酸苯那普利组(*P* < 0.05);治疗后灯盏花组与盐酸苯那普利组大鼠尿素氮比较差别无统计学意义(*P* > 0.05)。提示云南灯盏花胶囊和盐酸苯那普利治疗后均可降低 CRF 大鼠血清肌酐、尿素氮和 24 小时尿蛋白水平。云南灯盏花胶囊降低 CRF 大鼠血清肌酐、24 小时尿蛋白优于盐酸苯那普利,见表 1。

2.3 CTGF、Smad7 的变化

治疗后模型组、灯盏花组、盐酸苯那普利组 CTGF 值

表 1 治疗前、治疗后大鼠血清肌酐、尿素氮和 24 小时尿蛋白定量的变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 (mmol/L)	尿蛋白 (mg/24h)
正常组($n=13$)			
治疗前	68.69 \pm 5.93	5.28 \pm 1.28	14.24 \pm 5.56
治疗后	69.86 \pm 6.58	5.28 \pm 1.45	13.35 \pm 2.83
模型组($n=10$)			
治疗前	116.60 \pm 9.35 ^a	7.44 \pm 1.33 ^a	50.67 \pm 7.04 ^a
治疗后	117.25 \pm 6.75 ^a	7.74 \pm 1.29 ^a	46.93 \pm 5.66 ^a
灯盏花组($n=12$)			
治疗前	116.17 \pm 7.60 ^a	8.25 \pm 1.62 ^a	51.93 \pm 6.58 ^a
治疗后	93.70 \pm 8.26 ^{abc}	6.40 \pm 1.01 ^{ab}	35.64 \pm 5.85 ^{abc}
盐酸苯那普利组($n=11$)			
治疗前	116.17 \pm 7.60 ^a	8.36 \pm 0.99 ^a	50.79 \pm 5.92 ^a
治疗后	101.68 \pm 6.06 ^{ab}	6.46 \pm 1.24 ^{ab}	40.68 \pm 5.33 ^a

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与盐酸苯那普利组比较,^c $P < 0.05$

明显高于正常组,有统计学意义,模型组最高。灯盏花组显著低于盐酸苯那普利组($P < 0.05$);模型组、灯盏花组、盐酸苯那普利组 Smad7 mRNA 表达明显低于正常组,模型组最低。灯盏花组显著高于盐酸苯那普利组,具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2 和图 1。

表 2 治疗后各组大鼠 CTGF 和 Smad7 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	CTGF (ΔCt)	Smad 7
正常组($n=13$)	3.88 \pm 0.193	0.86 \pm 0.210
模型组($n=10$)	5.414 \pm 0.246 ^a	0.27 \pm 0.345 ^a
灯盏花组($n=12$)	4.07 \pm 0.199 ^{bce}	0.74 \pm 0.0309 ^{bce}
盐酸苯那普利组($n=11$)	4.33 \pm 0.235 ^{bd}	0.54 \pm 0.0408 ^{ad}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$,与正常组比较,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.01$;与模型组比较,^d $P < 0.05$;与盐酸苯那普利组比较,^e $P < 0.05$

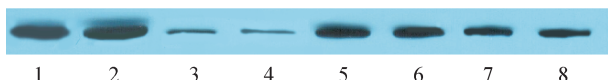


图 1 对大鼠肾组织中 Smad 7 mRNA 表达的影响

3 讨论

研究表明,转化生长因子- β_1 表达增强是肾脏纤维化形成的重要因素,TGF- β /Smad 信号通路是导致进展性肾脏纤维化的关键通路。Smad7 蛋白是 TGF- β 细胞内重要的信号传导分子,可与 TGF- β_1

型受体结合,传递细胞表面的 TGF- β 信号至细胞核内,抑制 R-Smad 的磷酸化,阻断 TGF- β_1 的信号传导,从而调节靶基因的转录^[2]。在肾脏纤维化过程中,Smad7 起负向调节作用,Smad7 mRNA 表达减少可导致 TGF- β 的过度反应,肾脏纤维化进程加速。在体外用反义寡核苷酸减少内源性 Smad7,可导致成纤维细胞内由 TGF- β 刺激引起的胶原合成的增加^[3]。在抗-Th1 抗体诱导的大鼠肾纤维化模型中,Smad7 表达也明显减少^[4]。因此,Smad7 在调控 TGF- β /Smads 信号和阻止细胞对 TGF- β 的过度反应方面起关键作用。Smad7 mRNA 表达增强,可减弱 TGF- β 信号传导,控制肾组织纤维化的进展。本次实验结果显示云南灯盏花胶囊可明显升高 Smad7 mRNA 表达,推测实验药物通过抑制 Smad7 的表达减弱了 TGF- β /Smads 信号传导,进而产生一系列生理效应。

结缔组织生长因子(CTGF)是 TGF- β_1 的下游效应介质,由肾系膜细胞、肾小管上皮细胞、肾成纤维细胞等多种细胞合成和分泌,通过促进细胞外基质产生和抑制细胞外基质降解双重途径诱导脏间质纤维化的发生。CTGF 作为一种较强的致纤维化细胞因子,在肾脏纤维化中扮演着重要的角色^[5]。本研究结果发现,云南灯盏花胶囊可抑制 CTGF 表达。推测云南灯盏花胶囊是通过调控 TGF- β /Smads 信号途径对下游 CTGF 因子产生抑制效应,其最终结果是可以减轻肾纤维化。

中医认为,慢性肾衰竭由于病变迁延日久,脏腑功能失调,其中尤以脾肾二脏为主。慢性肾病日久可致脾肾气虚,气弱无力运化,水湿浊毒滞留,气虚无力推动则形成血瘀。因此,慢性肾衰的病理变化是脾肾亏虚,瘀血湿浊毒留滞,整个病变以本虚标实为主要表现。治宜扶正祛邪,标本兼顾。扶正当以健脾补肾、益气温阳为主,祛邪则以活血化瘀、祛湿化毒为重。云南灯盏花胶囊是云南省中医医院的协定处方,主治早中期慢性肾功衰。方药组成为:云南灯盏花、薏苡仁、黄芪、苍术、生大黄、千张纸等。本方以云南灯盏花、薏苡仁、杜仲、黄芪为君,司活血泄浊、补肾健脾之职。淫羊藿、苍术、生大黄、山药辅助君药为臣,增强补肾健脾、益气泄浊之功。千张纸、党参共为佐使。全方起到扶正祛邪,补虚泄实的功效。灯盏花素是云南灯盏花的主要有效成分,灯盏花素具有活血化瘀、散寒通经等功效,能改善肾脏供血。实验也证明^[6-7],灯盏花素

对微血管内皮有独特的保护作用,能保护早、中期肾衰的残存肾功能,降低血肌酐、尿素氮及尿蛋白,减轻肾功能损伤,从而延缓慢性肾衰竭进展。

综上所述,云南灯盏花胶囊寓“活血泄浊、补肾健脾”之旨,实验结果表明其能抑制 Smad7 和 CTGF 表达,可延缓慢性肾衰大鼠进程。推测云南灯盏花胶囊延缓慢性肾衰竭进展的机制可能是通过调控 Smad7/TGF-β₁ 信号通路影响 CTGF 表达从而减轻肾脏纤维化,其具体疗效机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 何立群,郑平东,陈刚. 大鼠肾大部切除诱发慢性肾衰模型的建立[J]. 上海实验动物科学,2000,10:12-15.
 [2] Hills CE, Squires PE. TGF-β₁-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Therapeutic Intervention in Diabetic Nephrop-

athy[J]. Am J Nephrol,2010,31(1):68-74.
 [3] 杜磊,赵敬,赵宗江,等. 糖肾平对高糖 + LPS 刺激足细胞 TGF-β₁/Smad7、NF-κ B 信号转导通路影响的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2013,14(2):107-110.
 [4] 黄平,陈丹,华健,等. 山茱萸颗粒对糖尿病肾病大鼠 TGF-β₁/Smad7 通路的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012,13(9):762-764.
 [5] 张春,朱忠华,刘建社,等. 结缔组织生长因子在单侧输尿管梗阻大鼠肾脏中的表达及其意义[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(9):1786-1790.
 [6] 黄婧,文竹,冯勇. 灯盏花素治疗糖尿病肾病的临床观察[J]. 中国保健营养,2012,16:3347-3348.
 [7] 石少慧,王怀颖,张晶晶,等. 灯盏花素对肾缺血再灌注过氧化氢酶体损伤的保护作用[J]. 军医进修学院学报,2006,27(6):438-439.

(收稿日期:2014-01-07)

(本文编辑:董历华)

右归胶囊对肾阳虚不育模型大鼠生殖功能影响的实验研究

王旭昫 李海松 张宏 党进

【摘要】 目的 观察右归胶囊对腺嘌呤致肾阳虚不育模型大鼠生殖功能的影响。方法 以腺嘌呤灌胃 SD 大鼠,诱发肾阳虚不育模型,观察右归胶囊给药后实验动物睾丸、附睾、前列腺 + 精囊腺重量及睾丸曲细精管形态、曲细精管内各级生精细胞的数目和间质细胞的数目,各项指标皆与大鼠生殖功能有密切的关系。结果 右归组大鼠左侧睾丸、右侧睾丸,左侧附睾、右侧附睾,前列腺 + 精囊腺重量均低于正常组大鼠但高于模型组大鼠,差异有统计学意义。电镜下观察右归组大鼠睾丸病理切片,发现曲细精管萎缩较模型组明显减轻,各级生精细胞及间质细胞数量较模型组明显增多。结论 右归胶囊可提高腺嘌呤致肾阳虚不育模型大鼠生殖器官的重量,减轻腺嘌呤对睾丸曲细精管及各级生精细胞的损伤作用,对肾阳虚不育模型大鼠生殖功能具有保护作用。

【关键词】 右归胶囊; 肾阳虚; 不育; 生殖功能

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.09.003

Influence of *Yougui* capsule on Kidney-Yang deficiency infertility rats' reproductive function

WANG Xu-yun, LI Hai-song, ZHANG Hong, et al. Department of TCM, Luhe Teaching hospital of Capital Medical University, Beijing, 101149, China

Corresponding author: WANG Xu-yun, E-mail: xuyun1102@sina.com

【Abstract】 Objective To discuss the influence of *Yougui* capsule on Kidney-Yang deficiency infertility rats' reproductive function. **Methods** The Kidney-Yang deficiency infertility model was established by feeding adenine. And the influence of *Yougui* capsule on the rats' reproductive function was ob-

基金项目:北京市自然科学基金(7112074)

作者单位:101149 首都医科大学潞河教学医院中医科(王旭昫);北京中医药大学东直门医院男科(李海松、党进);北京中医药大学东方医院风湿科(张宏)

作者简介:王旭昫(1982-),博士,主治医师。研究方向:中医药治疗外科、男科疾病。E-mail: xuyun1102@sina.com