

肾间质纤维化模型大鼠转化生长因子 β /Smads信号传导通路变化与温阳活血方的干预***

胡绍进¹, 李 均²

Effects of Wenyang Huoxue recipe on transforming growth factor β /Smad signal transduction pathway in model rats of renal interstitial fibrosis

Hu Shao-jin¹, Li Jun²

Abstract

BACKGROUND: Transforming growth factor β /Smad signal transduction pathway plays an important role in the occurrence and development of renal fibrosis.

OBJECTIVE: To investigate the effects of Wenyang Huoxue recipe on transforming growth factor β /Smad signal transduction pathway in renal interstitial fibrosis rats.

METHODS: A total of 28 male SD rats of clean grade were randomly assigned into sham operation group and model group. Left urethral ligation was performed in rats to construct unilateral ureteral obstruction model. The left ureter of sham operation rats was isolated without ligation after opening the abdominal cavity; then the abdominal cavity was closed. The rats were administered with Wenyang Huoxue recipe by gavage once. Rats in both groups were administered by gavage for 14 days.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression of transforming growth factor β 1 and Smad3 in the Wenyang Huoxue group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$). The expression of Smad7 in the Wenyang Huoxue group was significantly larger than that in the model group ($P < 0.01$) and similar to that in the fosinopril group. It is conjectured that Wenyang Huoxue recipe may inhibit the expression of transforming growth factor β 1 and Smad3, increase Smad7 expression, thereby affecting the transforming growth factor β /Smad signaling pathway, and thus play a role in the prevention and cure of renal interstitial fibrosis.

Hu SJ, Li J. Effects of Wenyang Huoxue recipe on transforming growth factor β /Smad signal transduction pathway in model rats of renal interstitial fibrosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(11): 1923-1926.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 转化生长因子 β /Smad 信号转导通路在肾纤维化的发生发展中起重要作用。

目的: 探讨温阳活血方对肾纤维化转化生长因子 β /Smads 信号传导通路的影响。

方法: 选用清洁级雄性 SD 大鼠 28 只, 随机分为假手术组和模型组, 模型组行左侧输尿管结扎术, 单侧输尿管梗阻模型。假手术组大鼠打开腹腔后分离左侧输尿管但不结扎, 随即关闭腹腔。造模后第 2 天开始分别给予温阳活血方、血管紧张素转化酶抑制剂或生理盐水灌胃, 1 次/d, 各组均连续灌胃 14 d。

结果与结论: 温阳活血组转化生长因子 β 1、Smads3 的表达显著低于模型组($P < 0.01$), Smad7 表达显著高于模型组($P < 0.01$), 与福辛普利组相当。推测温阳活血方可能通过抑制转化生长因子 β 1、Smads3 的表达, 上调 Smad7 的表达, 进而影响转化生长因子 β /Smad 信号传导通路, 对肾间质纤维化起防治作用。

关键词: 肾间质纤维化模型; 温阳活血; 转化生长因子 β 1; Smads3; Smad7

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.11.006

胡绍进, 李均. 肾间质纤维化模型大鼠转化生长因子 β /Smads 信号传导通路变化与温阳活血方的干预[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(11): 1923-1926. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

研究发现, 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)是肾纤维化的关键因素, Smad蛋白是TGF- β 家族信号从受体到核的细胞内转导分子, TGF- β /Smad信号转导通路在肾纤维化的发生发展中起重要作用^[1-2]。有效切断TGF- β 的信号转导, 是终止和减轻肾纤维化的关键^[3]。

单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)是国内外公认的研究肾间质纤维化的较好模型。实验应用温阳活血中药对UUO模型大鼠进行干预性治疗, 并以血管紧张

素转化酶抑制剂福辛普利为对照, 观察了实验动物梗阻侧肾脏病理变化以及肾组织中TGF- β 1、Smad3和Smad7的表达。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2008-03/12在遵义医学院第五附属医院中心实验室完成, 实验室为省级重点实验室。

材料: 选用清洁级健康雄性SD大鼠28只, 体质量(200 $\pm$ 20) g, 由中山医科大学提供。随机分为4组: 假手术组、模型组、温阳活血方组、福辛普利组, 每组7只。

¹Department of Rehabilitation, the Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang 422000, Hunan Province, China;

²Department of Traditional Chinese Medicine, Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Hu Shao-jin★, Master, Department of Rehabilitation, the Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang 422000, Hunan Province, China
Hushaojin2006@yahoo.com.cn

Corresponding author: Li Jun, Doctor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Traditional Chinese Medicine, Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China
lijun69-1214@163.com

Supported by: the Foundation of Governor of Guizhou Province, No. C-263*; the Staring Foundation for Doctors of Zunyi Medical College, No.2004-007*

Received: 2011-07-08
Accepted: 2011-10-19

¹ 湖南省邵阳市中心医院康复科, 湖南省邵阳市 422000; ² 遵义医学院第五附属医院中医科, 广东省珠海市 519000

胡绍进★, 男, 1969 年生, 湖南省辰溪县人, 汉族, 2009 年遵义医学院第五附属医院中医科, 广东省珠海市 519000 Hushaojin2006@yahoo.com.cn

通讯作者: 李均, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 遵义医学院第五附属医院中医科, 广东省珠海市 519000 lijun69-1214@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)11-01923-04

收稿日期: 2011-08-08
修回日期: 2011-10-19
(20110708004/W · LX)

主要试剂和药物:

试剂及药物	来源
兔抗大鼠 TGF- β 1 多克隆抗体、 兔抗大鼠 Smad3 多克隆抗体、 兔抗大鼠 Smad7 多克隆抗体、 SP 试剂盒、DAB 显色剂	武汉博士德公司
福辛普利(商品名蒙诺)	中美上海施贵宝制药有限公司
温阳活血方	中山大学第五附属医院药剂科

实验方法:

UUO 模型建立: 大鼠麻醉后仰卧固定于手术台上, 局部脱毛, 腹部皮肤碘伏消毒 3 遍, 铺无菌手术巾。依次切开皮肤、皮下组织、肌肉、腹膜。游离肾脏及输尿管, 用 4 号缝合线从中段输尿管两旁双双线结扎输尿管, 然后连续缝合皮肤关闭腹腔^[5]。假手术组开腹后不结扎输尿管, 然后逐层缝合切口。于造模后第 2 天开始, 温阳活血方治疗组给予温阳活血药液 32 g/(kg·d) 释成冲剂 2 mL 灌胃, 1 次/d; 福辛普利组给予 10 mg/(kg·d) 福辛普利去胶囊释成冲剂 2 mL 灌胃, 1 次/d; 假手术组和模型组予每日 2 mL 生理盐水灌胃, 各组均连续灌胃 14 d。

肾组织病理: 肾组织用体积分数 10% 的中性甲醛固定 24 h 后, 经脱水、石蜡包埋、组织切片, 制成 4 μ m 石蜡切片, 常规做苏木精-伊红染色, 光镜下观察肾组织病理变化。

免疫组织化学检测肾组织 TGF- β 1、Smad3、Smad7: 均用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法即 SP 法, 体积分数 4% 甲醛固定的蜡块切片(4 μ m 厚)经 60 $^{\circ}$ C 60 min 烤片后常规脱蜡至水, 浸入体积分数 30% H_2O_2 10 min(去除内源性过氧化氢酶活性), 微波修复抗原, 冷却后滴加滴加过氧化物酶阻断溶液(试剂 A), 室温下孵育 10 min, 滴加正常非免疫动物血清(试剂 B), 室温下孵育 10 min, 滴加稀释的一抗(TGF- β 1 浓度为 1:100, Smad3 及 Smad7 浓度均为 1:50), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 滴加生物素标记的第二抗体(试剂 C), 室温孵育 10 min, 滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液(试剂 D), 室温孵育 10 min, 滴加 DAB 显色剂, 苏木精轻度复染, 以上各步后均以 PBS 洗 3 次, 3 min/次, 脱水, 透明, 封固, 镜检肾实质及间质细胞浆内棕褐色颗粒为阳性, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

图像定量分析: 肾组织病理, 双盲给予苏木精-伊红染色下肾间质损伤病变计分(包括肾小管扩张、萎缩、管型、坏死或小管炎), 小管间质损害

的特征按 Banff^[4] 分级进行 0~3+ 半定量计分: 肾小管无病理变化即没有肾小管扩张、萎缩、管型、坏死或小管炎评 0 分; 轻度病理改变评 1 分(发生病变的肾小管范围<视野的 25%); 中度评 2 分(病变肾小管范围占视野面积 26%~50%); 严重评 3 分(发生病变的肾小管范围>视野 50%)。记录连续不重叠的 10 个 400 倍视野的数值, 取其平均值来比较每例切片的肾小管间质区域病变的程度。免疫组织化学半定量分析, 结果用 HPIAS-1000 计算机图像自动分析系统进行分析, 每张切片随机选取 10 个高倍视野($\times 400$), 测定肾组织 TGF- β 1、Smad3、Smad7, 计算阳性染色面积占整个视野面积的百分比作半定量分析测定值。

主要观察指标: ① 各组大鼠肾脏病理改变。② 各组大鼠肾功能改变。③ 各组大鼠肾间质中 TGF- β 1、Smad3、Smad7 的表达。

统计学分析: 采用 SPSS 16.0 统计软件分析, 多组资料间比较采用单因素方差分析。LSD 法多重比较组间差异。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠 28 只, 分为 4 组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 肾小管间质的病理改变 假手术组肾脏未见病理改变, 模型组可见肾小管上皮细胞明显肿胀、空泡变性, 部分肾小管呈灶状萎缩, 小管管腔闭塞或扩张, 以皮质和近髓萎缩肾小管较多。间质可见大量炎性细胞浸润, 间质明显纤维化。而福辛普利组和温阳活血组炎细胞浸润, 上皮细胞变性萎缩程度和间质纤维化范围均比模型组轻($P < 0.05$)。肾间质损伤评分见表 1。

表 1 各组大鼠肾间质损伤评分结果
Table 1 Results of rat renal interstitial injury score ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Group	Renal interstitial injury score
Wenyang Huoxue	1.714 $\pm$ 0.756 ^{ab}
Fosinopril	1.571 $\pm$ 0.535 ^{ab}
Model	2.714 $\pm$ 0.488 ^a
Sham operation	0

^a $P < 0.01$, vs. sham operation group; ^b $P < 0.05$, vs. model group

2.3 各组大鼠肾功能测定结果 UUO 后第 14 天后, 造模各组尿素氮水平均有增高, 其中模型组与假手术组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。温阳活血组和福辛普利组与模型组相比有明显的降低($P < 0.05$), 温阳活血组和福辛普利组尿素氮水平差异无显著性意义($P > 0.05$)。各组肌

酞水平差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾功能测定结果比较
Table 2 Results of rat renal function ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Group	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
Model	40.41 $\pm$ 4.64	8.48 $\pm$ 0.99 ^a
Sham operation	38.96 $\pm$ 7.86	6.09 $\pm$ 0.97
Wenyang Huoxue	41.23 $\pm$ 6.74	6.82 $\pm$ 0.79 ^b
Fosinopril	42.25 $\pm$ 4.01	6.93 $\pm$ 0.55 ^b

^a $P < 0.01$, vs. sham operation group; ^b $P < 0.05$, vs. model group; Scr: serum creatinine; BUN: blood urea nitrogen

2.4 免疫组织化学染色结果

肾组织内TGF- β 1表达的变化: 假手术组几乎不表达TGF- β 1, 模型组大鼠的肾小管上皮细胞、肾间质成纤维细胞和炎性细胞中均有不同程度表达, 表现为黄褐色颗粒状沉积, 尤其在模型组。半定量分析显示, 与假手术组相比较, 其他3组TGF- β 1表达均增多(模型组 $P < 0.01$, 后二组 $P < 0.05$)。TGF- β 1在温阳活血组和福辛普利组的表达与模型组相比较有所降低 ($P < 0.05$); 而此2组差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表3, 图1。

表 3 各组大鼠肾组织中的转化生长因子 β 1 表达
Table 3 Expression of rat transforming growth factor β 1 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Group	Transforming growth factor β 1
Sham operation	1.747 0 $\pm$ 0.286 0
Model	13.454 3 $\pm$ 2.613 3 ^a
Wenyang Huoxue	5.191 6 $\pm$ 1.906 5 ^{ab}
Fosinopril	5.222 9 $\pm$ 1.477 3 ^{ab}
<i>F</i>	56.126

^a $P < 0.01$, vs. sham operation group; ^b $P < 0.05$, vs. model group

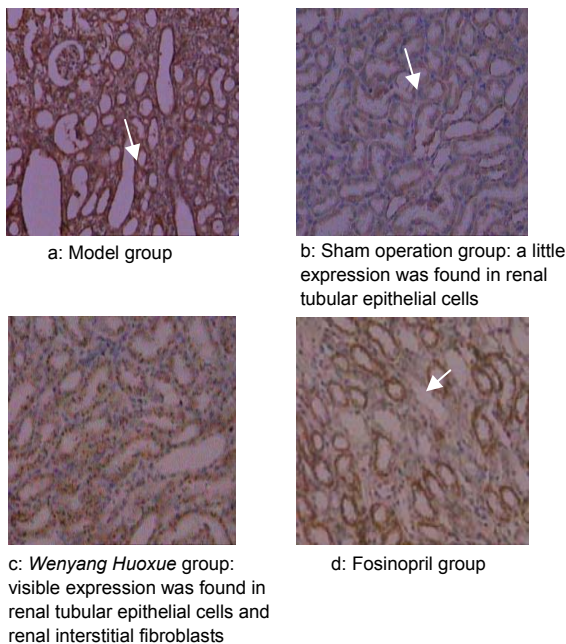


Figure 1 Expression of rat transforming growth factor β 1 ($\times 200$)

图 1 各组大鼠肾组织转化生长因子 β 1 表达($\times 200$)

肾小管间质中Smad3和Smad7表达: 见表4。

表 4 各组大鼠肾组织间质中 Smad3 和 Smad7 的表达
Table 4 Smad3 and Smad7 expression in rat renal interstitium ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Group	Smad3	Smad7
Wenyang Huoxue	5.508 6 $\pm$ 1.401 9 ^{ab}	5.098 $\pm$ 0.841 ^{ab}
Fosinopril	5.732 9 $\pm$ 1.594 3 ^{ab}	5.075 $\pm$ 1.016 ^{ab}
Model	13.597 6 $\pm$ 2.264 6 ^a	1.627 $\pm$ 0.376 ^a
Sham operation	2.129 9 $\pm$ 1.103 2	13.122 $\pm$ 1.356
<i>F</i>	64.854	

^a $P < 0.01$, vs. sham operation group; ^b $P < 0.05$, vs. model group

在模型组肾组织Smad3有丰富的表达, 表现为黄褐色颗粒状沉积; 在假手术组Smad3几乎不表达, 局限于肾小管, 肾小球偶见; 与假手术组相比较, 福辛普利组和温阳活血方组肾组织Smad3表达均增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 福辛普利组和温阳活血方组肾组织Smad3表达均减少($P < 0.01$); 与福辛普利组比较, 温阳活血方组差异无显著性意义($P > 0.05$)。见图2。

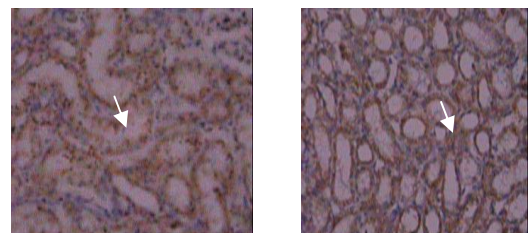
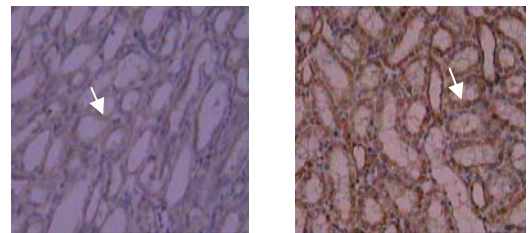
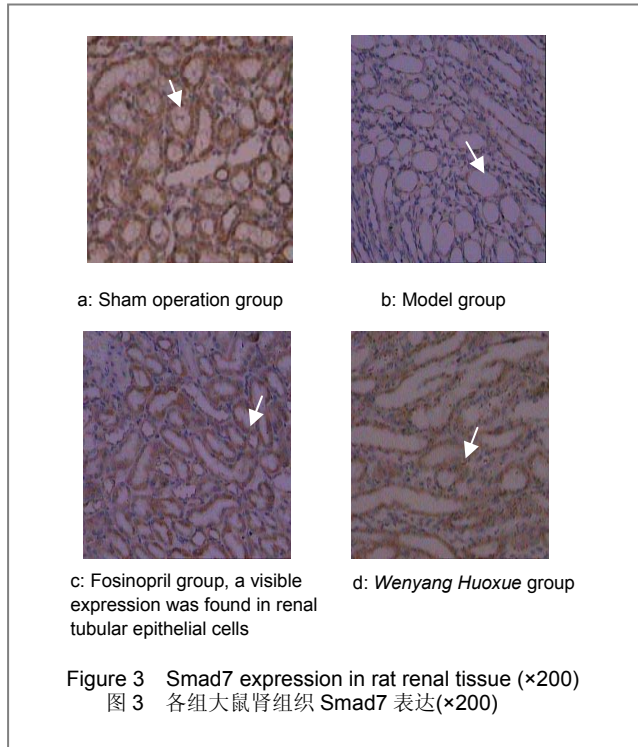


Figure 2 Smad3 expression in rat renal tissue ($\times 200$)
图 2 各组大鼠肾组织 Smad3 表达 ($\times 200$)

在假手术组肾组织Smad7有丰富的表达, 主要局限于肾小球和肾小管上皮细胞内, 表现为黄褐色颗粒状沉积。与假手术组相比较, 在模型组Smad7几乎不表达 ($P < 0.01$), 在福辛普利组和温阳活血组, Smad7表达均减少($P < 0.05$), 与模型组比较, Smad7表达均增多, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。与福辛普利组比较, 温阳活血组Smad7表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。见图3, 表4。



3 讨论

目前已初步认识有多条信号传导途径参与调节肾小管上皮细胞转分化, 其中最重要的信号传导途径是TGF- β /Smads途径^[5]。TGF- β 被认为是具有促肾纤维化作用的重要的生长因子, 它是参与肾小球硬化及肾小管间质纤维化的关键的细胞因子, 它促进基质蛋白的产生, 减少其降解, 在实验性肾损害动物模型中抑制TGF- β 的生物学活性可减轻细胞外基质的沉积及纤维化的进展。哺乳动物组织中存在3种TGF- β 亚型, 生物特性基本相同, 其中TGF- β 1所占比例最高, 主要分布在肾小管间质, 是介导细胞外基质沉积的重要因子。

研究发现, 在UUO模型中随梗阻时间延长, 伴随TGF- β 1含量明显增加^[6-7], 肾小管间质纤维化也进行性加重, 这说明TGF- β 1促使梗阻性肾病大鼠肾小管间质进行性纤维化。现已知TGF- β 主要通过Smad蛋白家族传递信号而发挥生物学效应。目前把Smads分为3类: 受体调节性、通用和抑制性Smads。Smad3为受体激活型蛋白, 参与ECM的合成和降解相关基因的表达调控, 介导TGF- β 1对系膜细胞Fibronectin基因的表达。促进肾纤维化的发生发展。Smad7受体抑制性蛋白, 可抑制TGF- β 1 I型受体蛋白(T β -RI)对Smad2和Smad3的磷酸化^[8], 增加泛素介导的TR I自身的降解^[9], 从而阻抗TGF- β 的信号转导, 抑制肾纤维化的发生及发展。

由于TGF- β /Smads信号转导通路对肾纤维化的发生及发展至关重要。因此, 抑制TGF- β 对靶基因的影响是防止肾纤维化的关键性治疗措施之一。也是慢性肾脏

疾病康复的重要环节。

温阳活血方由桃仁15 g, 红花15 g, 肉苁蓉20 g, 仙灵脾15 g, 牡丹皮15 g等组成。现代药理研究表明: 桃仁具有很好的抗肝纤维化、肺纤维化效果, 体外能抑制纤维母细胞增生作用, 其抗脏器纤维化作用肯定; 肉苁蓉、仙灵脾均具有提高肾上腺皮质功能、调节免疫、抗氧化作用; 红花具有抗血栓, 改善微循环作用; 丹皮具有抑菌、调节免疫功能。中医认为本病病机为本虚标实, 阳虚气滞、血瘀阻络是本病的病机特点之一。因此, 结合病机特点选用活血化瘀中药桃仁、红花, 温补肾阳中药肉苁蓉、仙灵脾, 有共奏温阳活血之功用。可见, 诸药合用既可标本兼顾, 针对肾络瘀阻的中医病机, 使络脉瘀阻可消, 阳气亏虚可益, 又有其现代药理学基础。故以该方为基础辨证防治肾间质纤维化发生, 延缓肾脏病发展进程是可行的。实验中, 温阳活血组间质内炎细胞浸润, 肾小管上皮细胞变性萎缩程度和间质纤维化范围比模型组轻。模型组TGF- β 1的表达较假手术组明显增强, Smad3的表达较假手术组明显增强, Smad7的表达较假手术组明显减少; 而温阳活血方治疗组TGF- β 1的表达较模型组明显减少, Smad3的表达明显减少, Smad7的表达明显增强。表明温阳活血方可能通过有效的降低UUO模型大鼠肾组织Smad3的表达, 增加模型大鼠肾组织Smad7的表达, 从而影响TGF- β /Smad信号转导而达到减轻肾间质纤维化、保护肾功能的目的。

4 参考文献

- [1] Pirk E, Hddln CH, Ten-Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J*. 1999;13(15):2105-2124.
- [2] Schiffer M, Von Gersdorff G, Bitzer M, et al. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl*. 2000; (77):45-52.
- [3] Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *ods Mod*. 2005;11(7):69-80.
- [4] Wang YP, Wang HQ, Li BX, et al. HeBei Yixue. 1999;3(3):1-3. 王亚平, 王海泉, 李伯祥, 等. 大鼠输尿管梗阻后肾间质病变及平滑肌肌动蛋白的表达[J]. 河北医学, 1999, 3(3):1-3.
- [5] Sporn MB, Martin BO, Smith AL, et al. The importance of context in cytokine action. *Kidney Int*. 1997;51:1352-1354.
- [6] Yang J, Zhao J, Zeng PQ, et al. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*. 2005;22(3):349-350. 杨军, 赵军, 曾雨清, 等. 转化生长因子- β 在梗阻性肾病大鼠肾小管间质纤维化中的作用. *中华实验外科杂志*. 2005, 22(3):349-350.
- [7] Choi YK, Moon IJ, Jung HK, et al. Prevention of tissue injury by ribon antisense to TGF-beta1 in the kidney. *Int J Mol Med*. 2005;15(3):391-399.
- [8] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad 7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000;6(6):1365-1375.
- [9] Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction. *J Leukoc Biol*. 2002;71(5):731-740.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 贵州省省长基金资助项目(C-263); 遵义医学院博士启动基金资助课题(2004-007)。

作者贡献: 设计、实施、评估者为本文作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。