

抗纤灵方对 5/6 肾切除小鼠 p38MAPK/NF- κ Bp65 介导的炎症因子的影响

王 颖¹ 麻志恒^{1,2} 钟利平¹ 余柯娜¹ 何立群¹

摘要 **目的** 观察抗纤灵方对慢性肾衰模型小鼠酪氨酸磷酸化蛋白激酶/核转录因子 p65 (p38MAPK/NF- κ Bp65) 介导的炎症因子的影响。**方法** 56 只 C57BL/6J 雄性小鼠, 随机选取 10 只作为假手术组, 余 46 只采用 5/6 肾切除制备慢性肾衰模型, 2 周后将造模成功的 33 只小鼠按照肌酐水平分层分为模型组、雷帕霉素组及抗纤灵方组, 每组 11 只。雷帕霉素、抗纤灵方组每日分别给予雷帕霉素 (0.13 mg/100 g) 及抗纤灵方组 (2 g/100 g) 各 0.5 mL 灌胃治疗, 模型组及假手术组灌胃等量蒸馏水, 连续用药 8 周后处死小鼠, 采用免疫组化法观察中性粒细胞表达水平; 应用免疫印迹法 (Western blot) 及 real-time PCR 法检测肾脏组织 p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白及 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组中性粒细胞阳性细胞数增多, p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白及 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 雷帕霉素及抗纤灵方组中性粒细胞阳性细胞数减少, p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白及 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。雷帕霉素除在降低 p38MAPK 蛋白表达方面优于抗纤灵方组 ($P < 0.05$) 外, 余指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 抗纤灵方参与 p38MAPK/NF- κ Bp65 介导的炎症因子的调控, 对肾纤维化所致的肾衰有一定的改善作用。

关键词 抗纤灵方; 慢性肾纤维化; 酪氨酸磷酸化蛋白激酶/核转录因子 p65; 炎症因子

Effect of Kangxianling Recipe on p38MAPK/NF- κ Bp65 Mediated Inflammatory Factors in 5/6 Nephrectomized Mice WANG Ying¹, MA Zhi-heng^{1,2}, ZHONG Li-ping¹, YU Ke-na¹, and HE Li-qun¹
1 Department of Nephrology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 2 Department of TCM Internal Medicine, Xinhua Hospital Chongming Branch Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai (202150)

ABSTRACT **Objective** To observe effects of Kangxianling Recipe (KXLR) on p38MAPK/NF- κ Bp65 mediated inflammatory factors in chronic renal failure (CRF) model mice. **Methods** Totally 56 C57BL/6J male mice (18 – 22 g) were recruited in this experiment. Ten were randomly selected as a sham-operation group. The rest 46 mice were used for preparing CRF model by 5/6 nephrectomization. Totally 33 successfully modeled mice were divided into the model group, the rapamycin (RAP) group, and the KXLR group according to serum creatinine (SCr) level, 11 in each group. Mice in the RAP group were administered with rapamycin (0.13 mg/100 g per day, 0.5 mL each time) by gastrogavage. Mice in the KXLR group were administered with KXLR (2 g/100 g per day, 0.5 mL each time) by gastrogavage. Equal volume of distilled water was administered to mice in the model group and the sham-operation group. Mice were sacrificed after 8 weeks of consecutive medication. The expression of neutrophils was observed using immunohistochemical assay. Expression levels of p38MAPK/NF- κ B p65 protein and TNF- α /IL-6 mRNA were detected by Western blot and Real-time PCR. **Results** Compared with the sham-operation group, the number of positive neutrophils increased, expression levels of p38MAPK/NF- κ B p65 pro-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81373615); 上海市中医药事业发展三年行动计划资助项目 (No.ZY3 - LCPT - 1 - 1006); 上海市科委重点科技攻关项目基金资助项目 (No.11DZ1973100)

作者单位: 1. 上海中医药大学附属曙光医院肾病科 (上海 201203); 2. 上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院中医内科 (上海 202150)

通讯作者: 何立群, Tel: 13127550831, E-mail: heliqun59@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.03.0365

tein and TNF- α /IL-6 mRNA were enhanced significantly in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the number of neutrophils was reduced, expression levels of p38MAPK/NF- κ B p65 protein and TNF- α /IL-6 mRNA were decreased significantly in the KXLR group and the RAP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). RAP showed better effect in decreasing p38MAPK protein expression than KXLR ($P < 0.05$). There was no statistical difference in the rest indices between the KXLR group and the RAP group ($P > 0.05$). Conclusions KXLR participated the regulation of p38MAPK/NF- κ B p65 mediated inflammation factors. It had certain improvement in renal fibrosis induced renal failure.

KEYWORDS Kangxianling Recipe; chronic renal fibrosis; p38MAPK/NF- κ Bp65; inflammatory cytokine

炎症和纤维化是许多慢性进展性肾脏疾病的共同特征^[1]。酪氨酸磷酸化蛋白激酶 p38 (P38MAPK) 被认为是调控炎症反应中重要的激酶,在调节包括炎症反应、细胞周期、细胞分化及细胞死亡等细胞生理过程中起重要作用^[2]。在不良刺激的作用下,p38 活化环上苏氨酸和酪氨酸两个位点都会被 MAPK 激酶双磷酸化,从而被激活为 P-PMAPK。核转录因子 p65 (NF- κ B P65) 是调节基因转录关键因子之一,在免疫、炎症反应、细胞增殖、凋亡等过程中同样发挥着重要的作用^[3,4]。研究表明,P38MAPK 参与 NF- κ B 等促炎 NF 的活化过程中,P38MAPK 信号通路与 NF- κ B 信号途径相互影响,共同参与或加重炎症的形成^[5,6]。

抗纤灵方是由何立群教授研制,扶正祛瘀的中药复方,已在上海中医药大学附属曙光医院应用多年。本课题组前期研究发现,抗纤灵方能调节 TGF- β_1 /P38MAPK 信号转导通路,降低 5/6 肾切除模型大鼠肾组织 NF- κ B 及 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达,改善血流动力学等以减轻肾组织的损害^[7-9]。本研究制备 5/6 肾切除慢性肾衰小鼠模型,进一步探索抗纤灵方的作用机制。

材料与方法

1 动物 56 只清洁级 C57BL/6J 小鼠,体重 18~22 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK (沪) 2008-0016。小鼠分笼饲养于上海中医药大学实验动物中心,予 12 h 光照,45℃ 湿度的环境中,自由饮水,进食标准普通饲料,适应性喂养一周后进行实验。

2 药物 抗纤灵方由丹参 15 g 桃仁 12 g 当归 12 g 怀牛膝 15 g 酒大黄 9 g 组成,由上海曙光医院中药房提供,经 2 位主任药师分别盲法鉴定,确保药材来源及质量,药物加水浸泡 24 h,大火加热煮沸后,再改文火煎煮 30 min,收集药液,再在药渣中加水同样煎煮 30 min,混合两次药液,浓缩至 100 mL,按照

20 g/kg 配成水煎剂,冰箱保存用于灌胃。雷帕霉素粉剂 10 mg,上海威奥生物公司提供 (批号:R706203),根据小鼠与人体 (60 kg) 每千克体重折算系数值,人鼠剂量 20 倍换算,水提浓缩,分别按照 2 g/100 g,0.13 mg/100 g,每只小鼠每天 0.5 mL 配成溶液。

3 试剂及仪器 TRIzol Reagent RNA 抽提试剂盒 (Invitrogen 公司,批号:15596-206); Prime Script RT reagent Kit (TaKaRa 公司,批号:K1622); 实时荧光定量试剂盒: SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa 公司,货号:RR037A); p38MAPK 抗体 (美国 CST 公司,货号:4257s); NF- κ Bp65、IL-6、TNF- α 抗体 (美国 Abcam 公司); β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司)。二抗 HRP 标记的 IgG 购自上海威奥生物科技有限公司 (批号:WH1102); 两步法免疫组化试剂盒 DAB 显色液购自武汉博士德公司。5417R 型高速低温离心机 (德国 Eppendorf 公司), ELX800 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), Mini Protean Cell 小型垂直电泳电泳槽、CFX-96 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

4 5/6 肾切除诱导的慢性肾衰模型的建立 按 Platt 法^[10] 建立慢性肾衰小鼠模型。以 3% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉小鼠,俯卧位暴露左肾区,在距左脊肋骨 1.5 cm 处做斜向外的切口,经后腹膜取出左肾,并暴露于外,剥离肾周脂肪及包膜后,弧形切除 2/3 肾组织 (主要切除皮质部分),消毒棉球压迫止血,观察切面无活动性出血后复位剩余左肾,然后逐层缝合腹膜、肌肉及皮肤,7 天后以相同的方法麻醉大鼠,完全游离右肾肾蒂后结扎,行右肾摘除,然后逐层缝合腹膜、肌肉及皮肤。2 次手术共切除肾脏约 80% 左右。

5 分组及给药 56 只小鼠随机选取 10 只作为假手术组,仅在手术时作背部切口,打开肾区皮肤肌肉并暴露肾脏后再缝合伤口。其余小鼠按以上方法制备慢性肾衰模型。2 周后采用小鼠眼内眦取血,测血肌酐

水平。将造模成功小鼠分为模型组、雷帕霉素组、抗纤灵组, 各组间血肌酐值比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。雷帕霉素及抗纤灵方组分别每日给予雷帕霉素(0.13 mg/100 g)及抗纤灵方(2 g/100 g)各 0.5 mL 灌胃治疗, 模型组和假手术组灌胃等量蒸馏水, 连续用药 8 周。

6 标本收集 处死前禁水 6 h, 以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 摘取左侧残肾, 用生理盐水冲洗, 冰上操作, 除去血污及脂肪等组织, 其中一部分肾组织常规固定, 4 μ L 切片后免疫组化法检测中性粒细胞的表达, 另一部分入冷存管, 存放于液氮罐中, 运用免疫印迹法(Western blot)和 real-time PCR 法, 测定肾脏组织中 p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白及 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达。

7 观察指标及检测方法

7.1 肾组织病理学检查 常规厚 4 μ m 切片, 行 HE 染色, 每组选取 6 张切片, 每张切片随机选择 10 个肾皮质视野, 进行半定量评分, 肾小管间质损害观察: 蛋白、红细胞管型、肾小管扩张、坏死、间质炎性细胞浸润、间质纤维病变。肾小球硬化损伤观察: 系膜细胞增殖, 球囊粘连与节段硬化, 新月体形成。每张切片随机选取 4 个视野, 按照病变面积分级: 0 分, 正常; 1 分, $< 25\%$; 2 分, $26\% \sim 50\%$; 3 分, $51\% \sim 75\%$; 4 分, $> 76\%$ 。每张切片由 2 位病理医生双盲法分别评分, 取平均值。

7.2 肾组织中性粒细胞表达检测 采用免疫组织化学法, 具体步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 灭活, 微波热修复抗原, 冷却后 PBS 洗涤, 5% BSA 封闭, 滴加兔抗中性粒细胞(1:400), 37 $^{\circ}C$ 孵育, 滴加二抗羊抗兔 IgG 后室温孵育, 滴加 SABC 复合物室温孵育 DAB 显色, 苏木素复染, 分化, 脱水, 透明, 封片, 镜检。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性染色为棕黄色, 400 倍光学显微镜摄取图像, 每组随机选取 6 个标本, 每个标本随机选取 5 个不重复视野进行拍摄并计算阳性细胞个数。

7.3 肾组织 p38MAPK 及 NF- κ Bp65 蛋白表达测定 采用 Western blot 法。液氮中取 50 mg 肾组织按比例加入苯甲基磺酰氟(PMSF)、组织裂解液(RIPA)、磷酸酶抑制剂等在冰上匀浆, 12 000 $\times g$, 离心 10 min, BCA 法测蛋白浓度, 确定上样量, 95 $^{\circ}C$ 变性 5 min, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白电转到硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 中封闭, 加入一抗 p38MAPK (1:800)、NF- κ Bp65 (1:800), 4 $^{\circ}C$ 封闭过夜; 第 2 天 TBS 洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:500), 室温下摇床上孵育 1 h; 按免疫印迹发光试剂盒说明书显影, 采用 Image J 测定各蛋白的相对光密度值, 以目的条带和内参 β -actin 条带的灰度比值分别表示各蛋白的表达水平。

7.4 肾组织 TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达水平检测采用 real-time PCR 法。液氮中取 50 g 肾组织加入 500 μ L RLA 冰上匀浆, 12 000 $\times g$, 常温离心 5 min, 取上清采用磁珠法 RNA 抽提试剂盒提取肾脏总 RNA, 核酸蛋白测定仪测定 RNA 纯度及含量, 取 2 μ L RNA 进行逆转录, 反应条件 65 $^{\circ}C$ 5 min, 42 $^{\circ}C$ 60 min, 70 $^{\circ}C$ 5 min, 合成 cDNA, 采用 20 μ L 反应体系进行 PCR 扩增, 反应条件 95 $^{\circ}C$ 30 s 预变性; 95 $^{\circ}C$ 5 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。引物合成(见表 1)根据已发表的基因库及参考文献设计, 由上海博彩生物技术有限公司合成。

8 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LDS 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

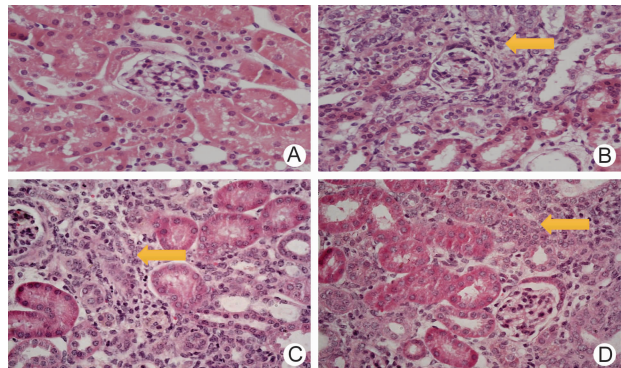
结 果

1 小鼠造模及死亡情况 46 只小鼠造模时和肌酐测定前死亡 13 只, 33 只小鼠分组后灌胃饲养, 取材时假手术组死亡 2 只, 模型组死亡 3 只, 雷帕霉素组死亡 2 只, 抗纤灵方组死亡 3 只。

表 1 目的基因及引物序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
TNF- α	上游: 5'-CTCATTCCCGCTCGTGG-3' 下游: 3'-CGTTTGGTGGTTTCGTCTCC-5'	200
IL-6	上游: 5'-CCGGAGGAGACTTCACAG-3' 下游: 3'-GAGCATTGGAAAGTTGGGGTA-5'	428
β -actin	上游: 5'-TCATGAAGTGACGGACGTTGACATCCGTAAAG-3' 下游: 3'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGACAGTGGAGGA-5'	285

2 各组小鼠肾组织 HE 染色变化(图 1) 光镜下观察,假手术组肾小球无病变或轻微病变,系膜细胞及基质无增生,肾小管无萎缩,肾小囊无扩张,肾间质无纤维化,无炎性细胞浸润。模型组、雷帕霉素组及抗纤灵方组及可见肾小球局灶节段性硬化,肾小囊扩张,球囊粘连,系膜细胞及基质中至重度增生,肾小管萎缩,肾间质可见大量炎性细胞浸润,细胞性纤维化。



注: A 为假手术组;B 为模型组;C 为雷帕霉素组;D 为抗纤灵方组;箭头所示为病理变化,图 2 同

图 1 各组肾组织病理形态学比较 (HE, ×400)

3 各组小鼠肾组织中性粒细胞免疫组化阳性表达(图 2) 光镜下观察,假手术组可见少许的染色为棕褐色的中性粒细胞,模型组中性粒细胞阳性细胞明显增多,经雷帕霉素及抗纤灵治疗后,两组阳性细胞明显减少。

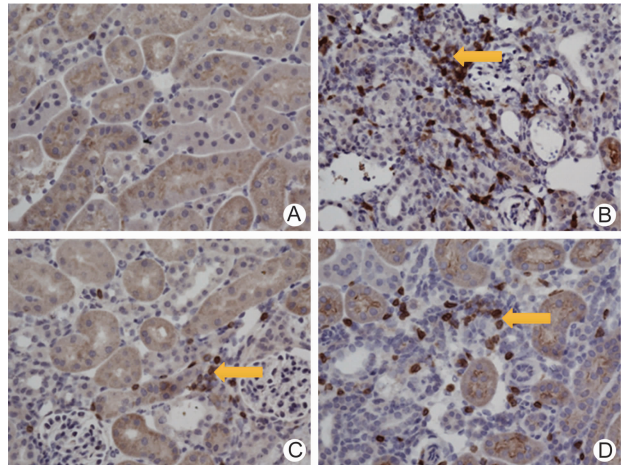


图 2 各组肾组织中中性粒细胞免疫组化阳性表达 (DAB, ×400)

4 各组肾组织中性粒细胞阳性细胞计数比较(表 2) 与假手术组比较,模型组中性粒细胞阳性细胞计数明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素与抗纤灵方组中性粒细胞阳性细胞计数下降($P < 0.01$)。雷帕霉素与抗纤灵方组中性粒细胞阳性细胞

计数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠肾组织中性粒细胞阳性细胞计数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性细胞个数
假手术	6	1.14 ± 0.99
模型	6	63.93 ± 7.95 *
雷帕霉素	6	30.93 ± 4.92 Δ
抗纤灵方	6	34.86 ± 4.34 Δ

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

5 各组肾组织 p-p38MAPK 及 NF- κ Bp65 蛋白表达水平比较(表 3、图 3) 与假手术组比较,模型组 p-p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白表达均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素与抗纤灵方组 p-p38MAPK 及 NF- κ Bp65 表达均明显下降($P < 0.01$)。雷帕霉素组 p-p38MAPK 蛋白表达水平明显低于抗纤灵方组($P < 0.05$)。

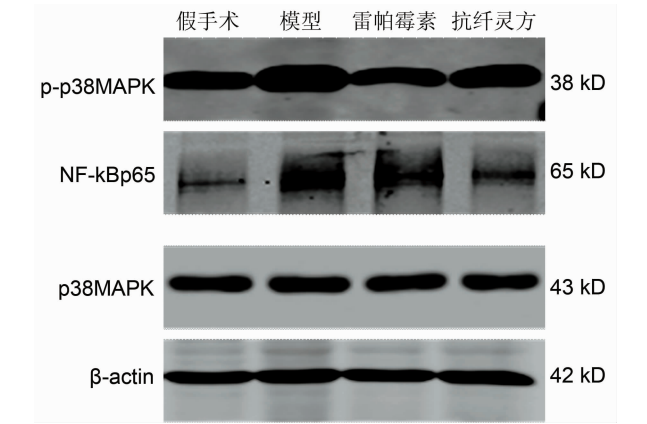


图 3 各组大鼠肾组织 p38MAPK 及 NF- κ Bp65 蛋白表达水平比较

表 3 各组小鼠肾组织 p-p38MAPK 及 NF- κ Bp65 蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-p38MAPK	NF- κ Bp65
假手术	9	1.02 ± 0.10	0.25 ± 0.04
模型	8	2.40 ± 0.25 *	1.18 ± 0.08 *
雷帕霉素	9	1.13 ± 0.132 Δ	0.55 ± 0.062 Δ
抗纤灵方	8	1.27 ± 0.112 Δ ▲	0.57 ± 0.052 Δ

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与雷帕霉素组比较, ▲ $P < 0.05$

6 各组肾组织 TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达水平比较(表 4) 与假手术组比较,模型组 TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素与抗纤灵方组 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达均明显下降($P < 0.01$)。雷帕霉素与抗纤灵方组 TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组小鼠肾组织 TNF- α 、IL-6 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-6
假手术	9	1.47 $\pm$ 0.24	0.44 $\pm$ 0.06
模型	8	3.22 $\pm$ 0.35 *	0.92 $\pm$ 0.08 *
雷帕霉素	9	2.04 $\pm$ 0.12 Δ	0.63 $\pm$ 0.06 Δ
抗纤灵方	8	2.18 $\pm$ 0.22 Δ	0.67 $\pm$ 0.04 Δ

注:与假手术组比较,*P<0.01;与模型组比较, Δ P<0.01

讨 论

中医学无“肾纤维化”一词,可归属于“关格”“溺毒”等范畴。中医基本病机为病势缠绵,久病入络,瘀阻血脉,浊毒内停造成微型癥积,据此病机其治疗方法以“活血化瘀,泻浊补肾”为主。抗纤灵方中丹参性微寒,补血活血;桃仁性平,祛瘀活血;当归性温,补血活血;牛膝性平,补肾活血;酒大黄性寒,清热泻浊活血,纵观全方以活血化瘀为主。

在慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)的发展过程中,研究发现,肾组织的炎症反应及其相关的肾小球硬化和肾间质纤维化是导致 CKD 进展至终末期肾衰的重要因素。其病理特征主要表现为炎症细胞在肾小球和肾间质内的浸润、活化以及相关信号通路的激活,其中 p38MAPK 信号通路在调控 CKD 肾组织炎症反应中起着重要作用^[11,12],是近年来国内外研究的热点。

p38MAPK 信号通路作为 MAPK 家族的主要成员,通过对细胞内信号的传递参与细胞对外界许多刺激的调节反应。p38MAPK 通过非磷酸化转化为磷酸化状态来促进下游底物的磷酸化,快速实现信号传递,因此磷酸化 p38 蛋白反映其真正的活性水平。p38MAPK 可以由细胞外的多种应激如紫外线、渗透压、热休克、促炎因子、活性氧簇、生物引物等刺激时发生磷酸化而被激活^[13],活化后的 p38MAPK 即 p-p38 可以进入细胞核内,调控多种核转录因子,如转录激活因子(ATF)-2、NF- κ B 等表达和生物活性,并参与多种因子的调节,抑制 p38MAPK 活性可以抑制 IL-6、IL-10、TNF- α 、TGF- β 1 及骨调素等多种细胞因子、生长因子的产生,提示 p38MAPK 是调节炎症因子产生信号通路上的重要介质^[14-16]。

NF- κ B 是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子,在静息状态时,NF- κ B 通常与其抑制物 I κ B 结合形成三聚体,以无活性的复合物形式存在于细胞浆中,当受到细胞外信号刺激时,I κ B 降解从而使 NF- κ B 与 I κ B 发生解离,并迅速从细胞浆易位到细胞核,与相

应基因上的 κ B 位点发生特异性的结合,进而调控细胞因子、趋化因子、黏附分子等相关基因的表达^[17,18]。已有研究发现,Ang II 能刺激肾小管上皮细胞表达活化 NF- κ B,引发单核巨噬细胞在间质的浸润,导致肾小管萎缩和肾间质纤维化^[19]。NF- κ B 的活化可促进其主要下游因子 TNF- α 表达,TNF- α 是早期炎症反应的重要介质,在肾组织炎症反应中,TNF- α 作为细胞因子网络中心之一,可引起多种炎性细胞因子 IL-1、IL-6 等的释放,导致 CRF 患者微炎症反应的级联^[20]。TNF 的下游因子 TRAF6 是 TNF 受体相关因子家族中唯一可以直接与 NF- κ B 受体激活因子相结合的信号分子,在 Toll 样受体介导的信号转导途径激活 NF- κ B,TRAF6 是激活 NF- κ B 通路和 MAPK 信号通路的交叉点,同时 NF- κ B 活化能激活下游 IL-6 mRNA 水平,从而增加体液内的 IL-6 水平^[21-23]。以上几种因子互为上下游关系的因子相互作用,扩大了对肾纤维化的作用^[24]。有研究甚至认为 NF- κ B 的活化在炎症反应时复杂的细胞因子网络中可能是中心环节。遏制其活化可减少多种炎性介质的产生,较单一的细胞因子拮抗剂效果更显著^[25]。

本次实验表明,模型组小鼠 p-p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白表达及 TNF- α 、IL-6 基因表达水平较假手术组明显升高,提示 5/6 肾切除后,p38MAPK 信号传导通路被激活,炎症反应明显增强,而抗纤灵方和雷帕霉素干预后 p-p38MAPK、NF- κ Bp65 蛋白及 TNF- α 、IL-6 基因表达水平显著下调,抗纤灵方和雷帕霉素比较,除雷帕霉素在抑制 p-p38MAPK 蛋白表达方面优于抗纤灵外,两药间其余指标比较,差异无统计学意义,提示两者可能具有类似的作用。抗纤灵方不仅对 5/6 肾切除大鼠 p38MAPK/NF- κ Bp65 介导的炎症因子有抑制作用,本研究发现其对小鼠肾组织 p38MAPK/NF- κ Bp65 介导的炎症因子也有一定的抑制作用。前期实验结果提示抗纤灵与氯沙坦有着等效的作用,此次又发现其与雷帕霉素有着类似的作用,故笔者推测,抗纤灵方可能通过不同的作用机制,发挥抑制纤维化的作用,这为今后采取敲除 Smad2/3 基因,阻断 TGF- β /Smad 通路,从 PI3K-AKT-mTOR 信号旁路途径研究抗纤灵多靶点防治肾脏纤维化提供一定的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end stage renal failure[J]. Intern Med, 2004, 43(1):

- 9-17.
- [2] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function [J]. *Cell Signal*, 2000, 12(1): 1-13.
- [3] Piotrowska A, Izykowska I, Podhorska-Okolów M, et al. The structure of NF-KappaB family proteins and their role in apoptosis [J]. *Postely Hig Med Dosw*, 2008, 62: 64-74.
- [4] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-KappaB signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [5] Williard DE, Twait E, Yuan Z, et al. Nuclear factor kappaB-dependent gene transcription in cholecystokinin and tumor necrosis factor alpha stimulated isolated acinar cell is regulated by P38 mitogen activated protein kinase [J]. *Am J Surg*, 2010, 200(2): 283-290.
- [6] Twait E, Williard DE, Samuel I, et al. Dominant negative p38 mitogen activated protein kinase expression inhibits NF-kappaB activation in AR42J cells [J]. *Pancreatolgy*, 2010, 10(2-3): 119-128.
- [7] 张新志, 黄迪, 吴锋, 等. TGF- β 1/p38MAPK 通路对肾间质纤维化影响及抗纤灵冲剂干预机制的实验研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(2): 245-247.
- [8] 张长明, 顾耀东, 符丹, 等. 活血化痰通络方对 5/6 肾切除大鼠肾功能及肾组织 P38MAPK 信号转导途径的干预作用 [J]. *河北中医*, 2012, 34(17): 1704-1706.
- [9] 符强, 何立群. 抗纤灵对 5/6 肾切除大鼠肾组织核因子 κ B 及肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 6 mRNA 表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(11): 2684-2686.
- [10] Platt R, Roscoe MH, Smith FW. Experimental renal failure[J]. *Clin Sci*, 1952, 11(3): 217-231.
- [11] Park KM, Kramers C, Vayssier-Taussat M, et al. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury, MAPK and MAPK kinase activation, and inflammation by remote transient ureteral obstruction[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(3): 2040-2049.
- [12] Tugtepe H, Sener G, Biyikli NK, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Regul Pept*, 2007, 140(3): 101-108.
- [13] Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(3): 1741-1748.
- [14] Leonard M, Ryan MP, Watson AJ, et al. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(4): 1366-1377.
- [15] Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis[J]. *Nature*, 1994, 372(6508): 739-746.
- [16] Sato H, Tanaka T, Kasai K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on renal dysfunction after hemorrhagic shock in rats [J]. *Shock*, 2005, 24(5): 488-494.
- [17] Guisjarro C, Egido J. Transcription factor- κ B (NF- κ B) and renal disease [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(2): 415-424.
- [18] Chen ZJ. Ubiquitin signaling in the NF-kappaB pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(8): 758-765.
- [19] Toblli JE, Cao G, Casas G, et al. NF-kappaB and chemokine-cytokine expression in renal tubulointerstitium in experimental hyper-oxaluria. Role of the renin-angiotensin system [J]. *Urol Res*, 2005, 33(5): 358-367.
- [20] Baud L, Ardaillou R. Tumor necrosis factor in renal injury[J]. *Miner Electrolyte Metab*, 1995, 21(4-5): 336-341.
- [21] 许国莹, 周红. 信号分子 TRAF6 的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(12): 1326-1328.
- [22] Ryan S, Taylor CT, Mc Nicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome[J]. *Thorax*, 2009, 64(7): 631-636.
- [23] Oliver KM, Garvey JF, Ng CT, et al. Hypoxia activates NF- κ B-dependent gene expression through the canonical signaling pathway[J]. *Antioxid Pexod Signal*, 2009, 11(9): 2057-2064.
- [24] 马晓红, 何立群. 健脾清化方对局灶节段性肾小球硬化大鼠 NF- κ B 及下游分子的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(2): 164-166.
- [25] Yamauchi M, Tamaki S, Tomoda K, et al. Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea [J]. *Sleep Breath*, 2006, 10(4): 189-193.

(收稿:2016-01-19 修回:2016-12-02)