

肾络通煎剂对梗阻性肾病大鼠肾间质纤维化的影响

王 箬^{1,2} 梁丽娟^{1,2} 王聪慧^{1,2} 王 蕊^{1,2} 姜国旺¹ 张晓曼¹ 安亚娟¹ 许庆友^{1,2}

摘要 **目的** 探讨肾络通煎剂对梗阻性肾病大鼠血清醛固酮、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、 α -平滑肌激动蛋白(α -smooth muscle protein, α -SMA)、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 表达的影响, 探讨肾络通煎剂改善肾间质纤维化的初步机制。**方法** 将 48 只健康 Wistar 大鼠随机分为假手术组(12 只)、造模组(36 只)。先采用单侧输尿管结扎(unilateral ureteral obstruction, UUO) 手术复制肾间质纤维化模型, 再将造模成功大鼠随机分为模型组、西药组 and 中药组, 每组 12 只。西药组(依普利酮)按照 100 mg/(kg·d) 剂量加入饲料中, 中药组按照 26 g/(kg·d) 的剂量入水瓶饮用, 假手术组和模型组给予等量生理盐水饮用, 每天 1 次。给药 10 天后摘取梗阻侧肾脏, 观察肾脏病理形态学, 检测血清醛固酮、MCP-1 含量, 肾组织 MCP-1、 α -SMA、NF- κ B mRNA 或蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织中大量炎性细胞浸润, 胶原沉积显著增加, 血清醛固酮及 MCP-1 含量显著升高 ($P < 0.01$), MCP-1 核酸和蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.01$), α -SMA 及 NF- κ B 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 西药组及中药组炎性细胞浸润及胶原沉积均减轻, 血清 MCP-1 含量降低, MCP-1 mRNA 及蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), α -SMA 及 NF- κ B 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 同时, 中药组血清醛固酮含量减少 ($P < 0.01$)。**结论** 梗阻性肾病模型鼠肾组织炎症损伤可促进肾间质纤维化。肾络通煎剂可通过减少血清醛固酮及 MCP-1 含量, 下调肾组织 MCP-1、NF- κ B 表达, 抑制 α -SMA 表达, 减轻肾间质纤维化。

关键词 肾络通煎剂; 肾间质纤维化; 盐皮质激素受体阻断剂; 炎症损伤; 单核细胞趋化蛋白-1

Effect of Shenluotong Decoction on Renal Interstitial Fibrosis in Rats with Obstructive Nephropathy
WANG Zheng^{1,2}, LIANG Li-juan^{1,2}, WANG Cong-hui^{1,2}, WANG Rui^{1,2}, JIANG Guo-wang¹, ZHANG Xiao-man¹, AN Ya-juan¹, and XU Qing-you^{1,2} 1 College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang (050091), China; 2 Department of Internal Medicine, College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Shenluotong Decoction (SD) on serum levels of aldosterone, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), α -smooth muscle protein (α -SMA), and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in obstructive nephropathy rats, and to explore the initial mechanism of SD for inhibiting renal interstitial fibrosis. **Methods** Totally 48 healthy Wistar rats were randomly divided into the sham-operation group ($n = 12$) and the model group ($n = 36$). Renal interstitial fibrosis rat model was established by unilateral ureteral obstruction (UUO). After successful modeling, 36 rats were randomly divided into the model group, the Chinese medicine group, and the Western medicine group, 12 in each group. Eplerenone was added in the forage at the daily dose of 100 mg/kg for rats in the Western medicine group. Chinese medicine was added in the forage at the daily dose of 26 g/kg for rats in the Chinese medicine group. Equal volume of normal saline was administered to rats in the sham-operation group and the model group. All medication was performed once daily. The obstructive kidneys were extracted ten days

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81273684); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20111323110008); 河北省自然科学基金资助项目 (No. C2011206042)

作者单位: 1. 河北中医学院中西医结合学院 (石家庄 050091); 2. 河北医科大学中西医结合学院内科教研室 (石家庄 050017)

通讯作者: 许庆友, Tel: 0311-86265272, E-mail: qingyouxu@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1238

after medication. The pathomorphological changes were observed. The contents of serum aldosterone and MCP-1, and the protein or mRNA expression of MCP-1, α -SMA, and NF- κ B were detected. Results Compared with the sham-operation group, infiltration of a large amount of inflammatory cells and collagen deposition significantly increased, serum contents of aldosterone and MCP-1 obviously increased ($P < 0.01$), the expression of MCP-1 mRNA and protein were significantly up-regulated ($P < 0.01$), the protein expression of α -SMA and NF- κ B were significantly enhanced in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, infiltration of inflammatory cells and renal collagen deposition were attenuated in the Chinese medicine group and the Western medicine group, the serum MCP-1 level were reduced, and the mRNA and protein expression of MCP-1 were significantly down-regulated ($P < 0.01$), the protein expression of α -SMA and NF- κ B were obviously inhibited ($P < 0.01$). At the same time, serum aldosterone level was reduced in the Chinese medicine group ($P < 0.01$). Conclusions Inflammatory lesions of the renal tissue could promote the progress of interstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. SD could attenuate interstitial fibrosis through reducing serum contents of aldosterone and MCP-1, down-regulating MCP-1/NF- κ B, and inhibiting the expression of α -SMA.

KEYWORDS Shenluotong Decoction; renal interstitial fibrosis; mineralocorticoid receptor blocker; inflammatory lesion; monocyte chemoattractant protein-1

单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 为一种重要的趋化因子,是慢性肾脏疾病中导致单核/巨噬细胞浸润的重要介质^[1,2]。MCP-1 可趋化和激活单核/巨噬细胞至炎症部位,释放细胞因子并启动后续的肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 病理过程^[3]。MCP-1 介导 RIF 的机制尚不明确,细胞表型转化和细胞增殖可能在其中发挥作用^[4,5]。有研究表明,MCP-1 能诱导肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化 (epithelial-myofibroblast transdifferentiation, EMT)^[6],说明 EMT 可能为 MCP-1 参与 RIF 的重要途径之一。血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 通过转化生长因子 (transforming growth factor- β , TGF- β) 途径促进 RIF 的机制已比较清楚,炎性介质在其中的作用也得以重视。随着对肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone, RAAS) 的深入研究,发现醛固酮可促进肾小球巨噬细胞浸润及 MCP-1 的分泌,诱导细胞表型转化,通过盐皮质激素受体阻断剂治疗可减轻间质炎症损伤及纤维化进展^[7]。还有研究指出,醛固酮可能通过 MCP-1/核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路诱导肾脏损伤^[8],通过抑制 MCP-1 及 NF- κ B,可下调 α 平滑肌激动蛋白 (α -smooth muscle protein, α -SMA) 表达,减缓 RIF 的进展^[9]。研究表明肾络通煎剂具有益气活血、化瘀通络的作用,是临床上用于慢性肾衰竭治疗的基本方,该方可延缓或防止慢性肾病的进展^[10]。本次实验针对单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 模型中炎性介质 MCP-1 分泌增多与醛固酮可

能相关的机制,给予醛固酮受体阻断剂依普利酮,观察是否能通过阻断其作用抑制炎性介质 MCP-1 的表达,从而抑制细胞表型转化,同时观察肾络通煎剂的调控作用,探讨其拮抗 RIF 的作用机制。

材料与方法

1 动物 清洁级雌性 Wistar 大鼠,8 周龄,体重 (180 ± 20) g,购于河北医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK (冀) 1205069。实验动物于河北医科大学中西医结合学院动物实验室饲养 1 周,温度 (20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,自由进食和饮水。

2 药物 依普利酮,美国 Pfizer 公司产品 (由日本 Research Diets, Inc 公司按 1.25 g/kg 加入饲料中)。肾络通煎剂 (组成:黄芪 15 g 蝉蜕 10 g 地龙 12 g 僵蚕 10 g 乌梢蛇 10 g 丹参 15 g 川芎 10 g 鳖甲 15 g) 由河北省石家庄市乐仁堂制成生药含量 0.33 g/mL 的中药煎剂。

3 试剂及仪器 醛固酮放射免疫分析药盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司 (生产批号:RA21207);MCP-1 抗体选用 Santa Cruz 抗体,试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司 (生产批号:1207B);NF- κ B、 α -SMA、GAPDH 抗体选用 Epitomics 抗体。紫外-可见分光光度计 (型号:756MC,上海精密科学仪器有限公司);电泳仪及电泳槽 (型号:DYY-12C,北京六一仪器厂);紫外透射仪 (型号:UV-254,北京鼎国公司);放射免疫计数器 Gamma RIA Counter (型号:FJ-2021R,国营二六工厂);基因扩增仪 (型号:9700,美国 Applied Biosystems 公司);凝

胶图像分析系统(Scion Image 4.0.3.2 图像分析系统);酶联免疫检测仪(型号:MK3,国营二六工厂)。

4 动物分组及模型制备 48 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、西药组、中药组,每组 12 只。大鼠单侧输尿管梗阻模型制备按照 Iwai T 方法^[11]。各组大鼠 10% 水合氯醛注射后,于左侧中腹部切开皮肤,游离左侧输尿管,分别在输尿管上 1/3 处和中 1/3 处用丝线结扎,切断输尿管,逐层缝合皮肤。假手术组仅将输尿管游离但不结扎离断。术后第 3 天肾脏组织病理显示大量炎性细胞浸润,第 5 天后胶原间质成分显著增多,符合 RIF 病理改变,模型复制成功。本次实验造模成功率为 92%,UUO 术后死亡大鼠 5 只,备用大鼠补足。

5 干预方法 术后开始给药,西药组大鼠给予依普利酮[100 mg/(kg·d),相当于临床人用药剂量 50 倍]加入饲料中喂食,中药组给予肾络通煎剂[26 g/(kg·d),相当于临床人用药剂量 20 倍]入水瓶饮用,假手术组及模型组给予等容量生理盐水饮用。连续干预 10 天。

6 检测指标及方法 干预结束后摘取左侧肾脏,部分组织置于 4% 多聚甲醛中固定,其余组织 -70℃ 低温保存以备指标检测。

6.1 肾脏病理形态学观察 取 4% 多聚甲醛固定标本,脱水、石蜡包埋,制成 3 μm 切片,行 HE、Masson 染色,光学显微镜下观察肾脏病理改变。

6.2 血清醛固酮检测 大鼠断头取血,留取血液标本 3 mL,注入硅化玻璃试管内,4℃、3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,-70℃ 低温保存。采用放射免疫分析法检测。按照试剂盒说明操作。

6.3 血清 MCP-1 含量检测 取血清标本,采用双抗体夹心 ELISA 测定,根据 ELISA 试剂盒说明操作。

6.4 MCP-1 mRNA 表达检测 采用 Real-time PCR 法。提取 RNA,反转录 cDNA 后扩增。Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (2×)10 μL,Forward primer (10 μmol/L)0.4 μL,Reverse primer (10 μmol/L)0.4 μL,ROX Reference Dye 0.4 μL,Template 2 μL,ddH₂O 6.8 μL,Total volume 为 20 μL。引物由 Invitrogen 公司合成。MCP-1 引物序列上游:5'-CTCAGCCAGATG-CAGTTAATGC-3',下游:5'-TCTCCAGCCGACT-CATTGG-3';β-actin 引物序列上游:5'-ATGTACG-TAGCCATCCAGGC-3',下游:5'-GGCGTGAGG-

GAGAGCATAG-3'。PCR 扩增条件:95℃ 变性 2 min(95℃ 15 s,各自的退火温度 34 s,60℃ 34 s)40 个循环;50℃ 变性 2 min。采用 2^{-ΔΔCT} 方法分析基因相对表达。

6.5 SABC 法检测 MCP-1 及 α-SMA 蛋白表达 石蜡切片脱蜡、梯度脱水,修复抗原后加入一抗(1:100)4℃ 过夜;清洗后二抗孵育 1 h,滴加 SABC 复合物,DAB 显色,以光镜下出现棕黄色颗粒为阳性表达,苏木精复染,脱水,透明,封片。免疫组织化学半定量分析方法:4 组大鼠每组选取 3 只大鼠标本,每个标本测量 20 个视野(×200),使用半定量分析方法评为 0-4 级,0 级:无表达;1 级:局部弱阳性表达;2 级:局部中度表达或广泛弱阳性表达;3 级:局部强阳性表达或广泛中度表达;4 级:广泛强阳性表达。以每个视野平均得分标准作为比较。

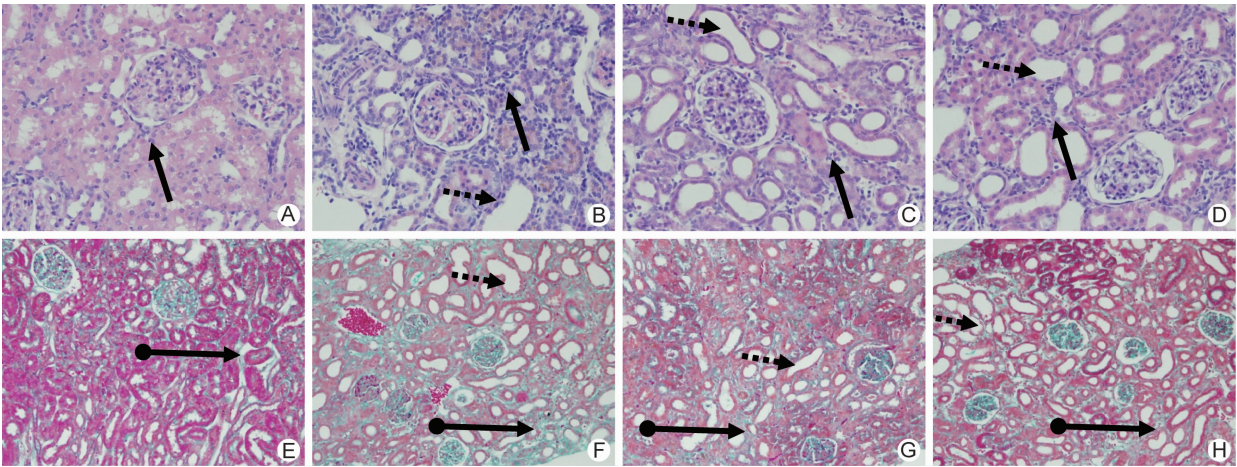
6.6 Western blot 法检测 MCP-1 及 NF-κB 蛋白表达 冰冻肾组织给以裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取并测定蛋白含量;取样品按比例加入 loading buffer 95℃ 煮沸 5 min 后待电泳;配制 SDS-PAGE 胶,上样蛋白 20 μg,电泳 90 V 到底;0.22 μm PVDF 膜(甲醛处理),20 V,40 min 半干转;5% 脱脂牛奶封闭 2~4 h,加入 1 抗(1:1 000),4℃ 过夜,TBST 清洗 10 min×3 次;加入二抗(1:20 000),室温 60 min,TBST 清洗 10 min×3 次,TBS 清洗 10 min 后显影,所得结果给以内参校正。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据比较前先进行正态性及方差齐性检验,满足正态性及方差齐性者,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠肾脏病理形态学结果比较(图 1) HE 染色结果提示:假手术组未见明显损伤;模型组肾间质大量炎性细胞浸润,肾小管明显扩张,上皮细胞变性、浊肿、脱落甚至坏死;西药组及中药组小管扩张及上皮细胞水肿坏死与模型组基本相同,但炎性细胞浸润明显减轻。Masson 结果提示:假手术组有少量胶原纤维表达,可见于肾小球/肾小管基底膜及肾间质;模型组胶原成分显著增多,以肾间质为主;西药组及中药组胶原纤维表达较假手术组增多,但与模型组相比明显减少。

2 各组大鼠血清醛固酮及 MCP-1 含量比较(表 1) 与假手术组比较,模型组血清醛固酮及 MCP-1 含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型



注:A、E 为假手术组;B、F 为模型组;C、G 为西药组;D、H 为中药组;下同;A - D 为 HE 染色结果;E - H 为 Masson 染色结果;→ :炎性细胞;---→:扩张的肾小管;—→:胶原成分

图1 各组大鼠肾脏病理形态学结果 (HE, ×200;Masson, ×100)

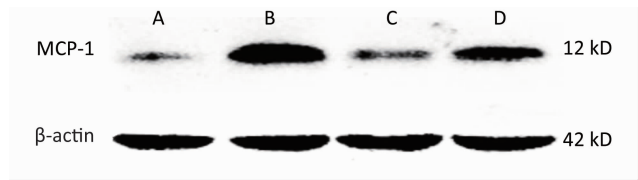
组比较,西药组血清醛固酮含量有下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$);中药组血清醛固酮含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);两组 MCP-1 含量均降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与西药组比较,中药组 MCP-1 含量升高($P<0.01$)。

表1 各组大鼠血清醛固酮及 MCP-1 含量比较 (pmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	醛固酮	MCP-1
假手术	12	0.70 ± 0.23	$0.43\pm0.16^*$
模型	12	$1.40\pm0.32^*$	$1.41\pm0.31^*$
西药	12	1.27 ± 0.35	$0.55\pm0.24^\Delta$
中药	12	$0.78\pm0.24^\Delta$	$0.65\pm0.20^\Delta\blacktriangle$

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

3 各组大鼠 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达比较 (表2,图2) 与假手术组比较,模型组 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达明显上调($P<0.01$)。与模型组比较,西药组及中药组 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达均下调($P<0.01$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组

图2 各组大鼠 MCP-1 蛋白表达

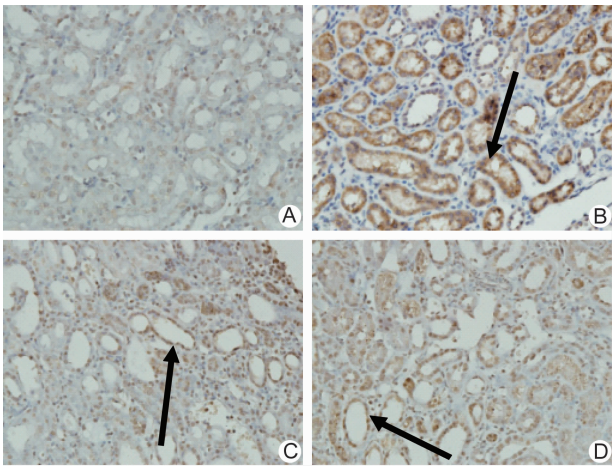
4 各组大鼠 MCP-1 蛋白表达比较 (表3, 图3) 与假手术组比较,模型组中 MCP-1 蛋白表达明显增强,差异有统计学意义($P<0.01$),主要表达于肾小管

表2 Western blot 及 Real-time RT-PCR 检测大鼠 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MCP-1/ β -actin	MCP-1/ β -actin mRNA
假手术	5	0.10 ± 0.05	1.00 ± 0.22
模型	5	$1.00\pm0.10^*$	$17.05\pm1.90^*$
西药	5	$0.25\pm0.08^\Delta$	$7.56\pm1.92^\Delta$
中药	5	$0.50\pm0.27^\Delta$	$12.40\pm2.95^\Delta$

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

上皮细胞胞浆。与模型组比较,西药组及中药组 MCP-1 蛋白表达均显著减弱,差异有统计学意义($P<0.01$)。

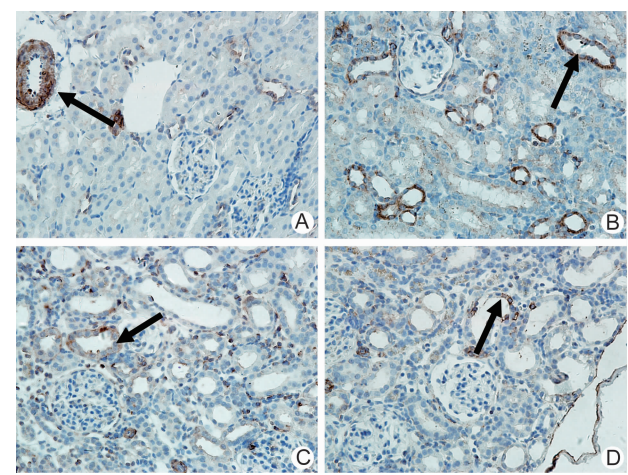


注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组;箭头所指为 MCP-1 在肾小管上皮细胞的表达

图3 各组大鼠 MCP-1 蛋白表达比较 (SABC, ×200)

5 各组大鼠 α -SMA 蛋白表达比较 (表3, 图4) 假手术组 α -SMA 仅表达于血管,肾间质及上皮细胞未见表达;模型组 α -SMA 表达明显增强,以扩张的肾小管表达为甚,间质亦可见到阳性表达;西药组及中药组

α-SMA局部呈中度表达,间质可见少量表达。其中,模型组较假手术组 α-SMA 的表达显著增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),与模型组比较,西药组、中药组 α-SMA 的表达下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



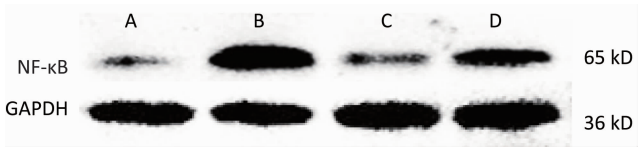
注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组;
箭头所指为 α-SMA 在血管平滑肌细胞表达(图 A);B、C、D、
α-SMA 在肾小管上皮细胞表达(图 B-D)

图 4 各组大鼠 α-SMA 表达 (SABC, ×200)

表 3 SABC 法检测 MCP-1 及 α-SMA 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	MCP-1	α-SMA
假手术	5	0.96 ± 0.14	0.74 ± 0.13
模型	5	3.16 ± 0.27 *	3.73 ± 0.14 *
西药	5	2.08 ± 0.20 ^Δ	1.90 ± 0.28 ^Δ
中药	5	2.13 ± 0.23 ^Δ	1.97 ± 0.36 ^Δ

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

6 各组大鼠 NF-κB 蛋白表达比较(表 4, 图 5)与假手术组比较,模型组 NF-κB 蛋白表达明显上调($P < 0.01$)。与模型组比较,西药组及中药组其表达均下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组

图 5 Western blot 检测 NF-κB 表达

表 4 Western blot 检测 NF-κB 表达 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	NF-κB/GAPDH	
假手术	5	0.100 ± 0.019	
模型	5	0.800 ± 0.161 *	
西药	5	0.440 ± 0.084 ^Δ	
中药	5	0.500 ± 0.089 ^Δ	

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

讨 论

炎症损伤在慢性疾病持续进展中发挥着关键作用,故抗炎治疗对于慢性疾病的进展有着重要意义^[12]。RIF 的形成有多种因素共同发挥作用,如血管活性物质、细胞因子、氧化损伤等,其中炎症损伤与 RIF 的持续进展密切相关^[13],这种损伤并非单纯由外界感染所导致,而是以内源性炎症损伤为主。Ang II 通过 TGF-β 途径促进 RIF 的机制已比较明确,应用血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)及血管紧张素 II 受体阻断剂(angiotensin II receptor blockers, ARB)后可减轻慢性肾脏疾病的结构和功能损伤^[14],但仍有不少患者使用足量 ACEI 及 ARB 治疗亦未能有效。随着对 RAAS 的深入研究,发现醛固酮也可作为一个独立的致病因素诱导炎症损伤^[15],且常与 Ang II 相互作用,共同促进纤维化的进展。因此,阻断醛固酮造成的炎症损伤对于减缓肾脏病的进展有重要意义。

单核/巨噬细胞是引起 RIF 的重要炎症细胞,在肾损伤局部浸润的巨噬细胞分泌多种前炎症因子和致纤维化因子,加强局部炎症反应,导致肾纤维化的形成^[16]。MCP-1 是单核/巨噬细胞特异性趋化物和结合物。在正常肾组织中有少量表达,而发生炎症反应时,包括巨噬细胞在内的很多细胞,例如肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞及足细胞等都可以分泌 MCP-1。

MCP-1 的主要功能为趋化和激活单核细胞/巨噬细胞至炎症部位,还可活化并促进血管平滑肌细胞、肾小管上皮细胞等固有细胞产生炎症因子,进一步放大间质的炎症反应,促进 RIF。有研究表明,MCP-1 可能介导单核/巨噬细胞参与 RIF,又可通过分泌 IL-6、TGF-β 等生长因子从而上调胶原纤维的合成和成纤维细胞增生,是肾脏病进行性发展的重要因子^[17]。

MCP-1 可诱导肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)^[18],而 EMT 是 RIF 的重要机制之一^[19]。α-SMA 作为 EMT 的特异性标志物在 RIF 进展中的重要性日益受到人们的关注。正常肾脏中仅有血管平滑肌细胞强阳性表达 α-SMA,其他细胞则不表达。肾组织内 α-SMA 表达升高,表明肾脏固有细胞由静止表型转化为增殖表型或分泌表型,即发生了细胞表型转化。肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞、间质成纤维细胞表达 α-SMA 标志着这些肾脏固有细胞被激活或异常增殖,具有肌成纤维细胞特性,合成和分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增多,参与纤维化进展。有研究表明,

在 UUO 模型的肾病中, MCP-1、 α -SMA 表达明显增高, 提示在 UUO 所导致的肾病模型中存在肾小管上皮细胞表型转化现象, 并且在肾小管间质纤维化中起着重要作用^[20]。

MCP-1 诱导 EMT 的机制尚不明确, TGF- β 可能在此过程中起到重要作用^[21,22]。但有研究显示骨形成蛋白 - 7 (bone morphogenetic proteins, BMP-7) 可以完全抑制 TGF- β 诱导的肾小管上皮细胞转分化, 但只能部分抑制 MCP-1 诱导细胞转分化, 提示提示 MCP-1 诱导 EMT 可能与非 TGF- β 依赖的途径有关^[23]。本研究观察了磷酸化 NF- κ B (p65) 的改变, 探讨炎性介质 MCP-1 诱导 NF- κ B 活化对 α -SMA 的表达的影响。

NF- κ B 作为转录因子, 在炎症损伤中有重要的调控作用, 其激活被认为是细胞表型转化的启动因素, MCP-1 可刺激 NF- κ B 活化, 进入细胞核内, 诱导细胞的表型转化。MCP-1 可趋化募集特异性受体 CCR2 阳性炎症细胞(主要为单核/巨噬细胞)向肾间质浸润, 与 IKK 结合, 此复合物被 RIP 激活, 可使 NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B α , I κ B α) 磷酸化, 从 NF- κ B 分离, 从而激活炎性反应基因 NF- κ B^[24]。活化的 NF- κ B 可促使成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 影响成纤维细胞表型的改变并表达 α -SMA, 产生大量 I 型和 III 型胶原, 引起肾间质 ECM 的沉积。本实验证实 MCP-1 在梗阻性肾病小管上皮细胞呈高表达, 与 NF- κ B、 α -SMA 的高表达一致。

MCP-1 的增多与很有因素有关, Ang II 可诱导其产生, 在梗阻性肾病中, 醛固酮可能发挥着更重要的介导作用。醛固酮调节水钠代谢不仅对血液动力学有调控作用, 亦可引起氧化损伤、炎症损伤^[25]。研究显示, 抑制 NF- κ B 通路可阻断醛固酮诱导的 MCP-1 的产生, 说明醛固酮可能通过 NF- κ B 通路诱导肾脏炎症因子表达和炎症细胞浸润, 最终导致严重的肾间质炎症浸润和纤维化, 故阻断醛固酮的效应可能具有肾脏保护作用。

依普利酮是新型的具有高度选择性的醛固酮受体阻断剂, 可减轻肾小球的超滤作用, 减轻高血压患者的蛋白尿及糖尿病大鼠的血管损害。一些实验研究如醛固酮导致的炎症损伤及氧化应激, 通过盐皮质激素受体阻断剂的治疗, 可以减轻其损害^[26]。本次实验观察其对细胞表型转化的影响, 结果证实依普利酮可以通过阻断醛固酮作用, 下调炎性介质 MCP-1 表达, 抑制 NF- κ B 活性, 从而抑制细胞的表型转化, 减轻肾脏损伤。

肾络通煎剂是河北医科大学赵玉庸教授治疗肾脏

病的有效验方^[27], 方中蝉蜕、地龙、僵蚕、乌梢蛇, 性喜走窜、善入络脉, 搜风祛痰, 化瘀通络; 川芎活血行气、丹参养血活血; 鳖甲软坚散结; 又因久病多虚, 加黄芪以扶助正气以抗邪。诸药相伍通补并用、标本兼顾^[10]。现代药理研究证实肾络通煎剂可以通过抑制细胞增殖、抑制 TGF- β 的过度表达以保护肾功能^[28,29]。中药的保护作用及机制是否与拮抗醛固酮以及炎性介质 MCP-1 有关是本研究的关注点, 结扎大鼠单侧输尿管复制 RIF 动物模型并给予肾络通煎剂, 结果显示肾络通煎剂可以通过抑制醛固酮的分泌及 MCP-1 的表达, 抑制 NF- κ B 通路减轻细胞表型转化。肾络通煎剂与依普利酮联合治疗是否会得到更为理想的结果尚不明确, 有待今后的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Zheng D, Wolfe M, Cowley BD, et al. Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominal polycystic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2588 - 2595.
- [2] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2503 - 2515.
- [3] Giunti S, Barutta F, Perin PC, et al. Targeting the MCP-1/CCR2 system in the diabetic kidney disease[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2010, 8(6): 849 - 860.
- [4] Ohshima K, Mogi M, Nakaoka H, et al. Inhibition of MCP-1/CCR2 signaling pathway is involved in synergistic inhibitory effects of irbesartan with rosuvastatin on vascular remodeling[J]. J Am Soc Hypertens, 2012, 6(6): 375 - 384.
- [5] Park Js, Jo Ch, Kim S, et al. Acute and chronic effects of dietary sodium restriction on renal tubulointerstitial fibrosis in cisplatin-treated rats[J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(3): 592 - 602.
- [6] Wehbe M, Souddja SM, Mas A, et al. Epithelial-mesenchymal-transition-like and TGF- β pathways associated with autochthonous inflammatory melanoma development in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(11): 457 - 467.
- [7] Qin D, Morita H, Inui K, et al. Aldosterone mediates glomerular inflammation in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis[J]. J Nephrol, 2013, 26(1): 199 - 206.
- [8] Han SY, Kim CH, Jee YH, et al. Spionlactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflam-

- matory mechanism in type 2 diabetic rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(5): 1362–1372.
- [9] Zhu W, Pang M, Dong L, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (Lour) Merrill (Rubiaceae) on uric acid nephropathy rats[J]. Life Sci, 2012, 91(11): 369–376.
- [10] 赵玉庸, 陈志强, 于春泉, 等. 肾络通治疗系膜增生性肾小球肾炎的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(12): 909–911.
- [11] Iwai T, Kitamoto K, Teramoto K, et al. Cobalt protoporphyrin attenuates rat obstructive nephropathy: role of cellular infiltration[J]. Urology, 2008, 72(2): 432–438.
- [12] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities[J]. Science, 2013, 339(6116): 166–172.
- [13] Grande MT, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM. Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy[J]. J Inflamm (Lond), 2010, 4(22): 7–19.
- [14] Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, et al. Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 298–309.
- [15] Wagman G, Fudim M, Kosmas CE, et al. The neurohormonal network in the RAAS can bend before breaking[J]. Curr Heart Fail Rep, 2012, 9(2): 81–91.
- [16] Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, et al. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetes, 2000, 49(3): 466–475.
- [17] Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy[J]. Am Physiol Soc, 2008, 294(4): 697–701.
- [18] Lee SH, Kang HY, Kim KS, et al. The monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCR2 system is involved in peritoneal dialysis-related epithelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells[J]. Lab Invest, 2012, 92(12): 1698–1711.
- [19] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1): 1–12.
- [20] 丁跃玲, 李增明, 徐华洲. 柴苓汤对 UUO 模型大鼠肾小管间质 α -SMA、MCP-1 的影响研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 9–10.
- [21] 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 Chin Invest, 2003, 112(1): 503–516.
- [22] Dai C, Yang J, Liu Y. Transforming growth factor- β potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling[J]. J Biochem, 2003, 278(2): 12537–12543.
- [23] 谭小月, 郑法雷, 周秋根, 等. 骨形成蛋白-7 对 MCP-1 诱导人肾小管上皮细胞转分化和 TGF- β_1 -Smad 3 信号转导的作用[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(37): 2607–2612.
- [24] Lei XH, Tu WP. Research progress of NF- κ B and nephropathy[J]. Prac Clin Med, 2007, 12(8): 130–133.
- [25] Sun GP, Kohno M, Guo P, et al. Involvements of Rho-kinase and TGF- β pathways in aldosterone-induced renal injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(8): 2193–2201.
- [26] Samavat S, Ahmadpoor P, Samadian F. Aldosterone, hypertension, and beyond[J]. Iran J Kidney Dis, 2011, 5(2): 71–76.
- [27] 许庆友, 韩琳, 秦国建, 等. 赵玉庸“肾络瘀阻”病机学说及临床应用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 702–704.
- [28] 丁跃玲, 赵玉庸, 陈志强, 等. 肾络通对肾小管间质纤维化大鼠肾素-血管紧张素系统的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1): 28–29.
- [29] 王亚利, 赵玉庸, 陈志强, 等. 肾络通对大鼠系膜细胞外基质分泌及转化生长因子 β_1 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(5): 201–203.

(收稿: 2013-06-21 修回: 2013-12-11)