

傣药雅盼对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的影响*

王 坚¹,袁红伶^{2 Δ}

(1. 云南省第一人民医院肾内科,昆明 650032;2. 昆明医科大学第一附属医院呈贡分院肾内科,昆明 650500)

[摘要] 目的 观察傣药雅盼对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠转化生长因子(TGF)- β 1/Smads 信号转导通路的影响,从而探讨该药对肾间质纤维化抑制作用的可能机制。方法 120 只雄性大鼠行单侧输尿管结扎建立 UUO 大鼠模型,生理盐水灌胃或给药 28 d 后收集血清检测尿素氮(BUN)、肌酐(Scr),处死大鼠,取其肾组织行 HE 染色和 Masson 染色,免疫组织化学法检测 TGF- β 1、Smad2、Smad7 在肾组织的表达;反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 的表达;Western blot 检测蛋白表达。结果 傣药雅盼各剂量组能降低大鼠 BUN、Scr 水平,并减轻肾小管-间质炎性细胞及肾间质纤维化程度,同时使 TGF- β 1、Smad2 mRNA 和蛋白表达上调($P < 0.05$),而 Smad7 mRNA 和蛋白表达下调($P < 0.05$)。结论 傣药雅盼各浓度组均可以在一定程度抑制 Smad2 mRNA 的表达,上调 Smad7 mRNA 的表达,通过干预 TGF- β 1/Smads 信号转导通路抑制了 TGF- β 1 在肾组织的表达从而对 UUO 大鼠肾间质纤维化。

[关键词] 傣药雅盼;肾间质纤维化;转化生长因子- β 1;单侧输尿管梗阻;大鼠

[中图分类号] R453.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)31-4325-04

Effect of Dai medicine Yapan on TGF- β 1/Smads signaling transduction pathway in unilateral ureteral obstruction rats*

Wang Jian¹, Yuan Hongling^{2 Δ}

(1. Department of Nephrology, Yunnan Provincial First People Hospital, Kunming, Yunnan, 650032, China;

2. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University Chenggong Sorting, Kunming, Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Dai medicine Yapan on TGF- β 1/Smads signaling transduction pathway in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats, and to explore its possible mechanism in rat renal interstitial fibrosis inhibitory effect. **Methods** The UUO rat model was established by conducting the unilateral ureteral obstruction(UUO) in 120 male rats. Normal saline gavage or medication were performed for 28 d and serum was collected for detecting BUN and Scr. Then the rats were killed for taking the renal tissue and conducting HE and Masson staining. The expression of TGF- β 1, Smad2 and Smad7 in kidney tissues were detected by using the immunohistochemical method. The mRNA expression was detected by RT-PCR; the protein expression was detected by Western blot. **Results** Various Yapan doses groups could reduce the level of serum BUN and Scr in experimental rats, alleviated renal tubular interstitial inflammatory cells and renal interstitial fibrosis degree, meanwhile up-regulated the expression of TGF- β 1, Smad2 mRNA and protein ($P < 0.05$), while down-regulated the expression of Smad7 mRNA and protein ($P < 0.05$). **Conclusion** Different concentrations groups of Dai medician Yapan may inhibit Smad2 mRNA expression in some extent, up-regulates Smad7 mRNA expression, inhibits the expression of TGF- β 1 in kidney tissues through interfering TGF- β 1/Smads signaling transduction pathway, thus obtains a therapeutic effect for inhibiting kidney interstitial fibrosis in UUO rat.

[Key words] Dai medician Yapan; renal interstitial fibrosis; transforming growth factor- β 1; unilateral ureteral obstruction; rats

肾间质纤维化是所有慢性肾脏病进展的重要病理基础,比肾小球硬化更能反映肾脏受损伤的程度^[1]。如何抑制肾间质纤维化一直是一个值得探讨的话题。傣药雅盼在民间长期运用于肾炎、风湿性关节炎等的治疗。本研究将从分子生物学角度来证实傣药雅盼在治疗肾衰竭方面的作用,为民族医药的临床应用提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂盒 雅盼由云南省中药研究所提供;盐酸苯那普利(洛丁新)购自北京诺华制药有限公司;转化生长因子(TGF)- β 1 购自美国 Santa Cruz 公司;鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司;Smad2、Smad7 多克隆抗体购自美国 Protech 公司;MCP-1 购自英国 Abcam 公司。

1.1.2 实验动物 清洁级雄性大鼠 120 只(6 周龄,购自昆明

医科大学动物科),体质量(200 \pm 25)g,饲养条件:室温 18~25 $^{\circ}$ C,相对湿度 40%~60%,自由摄入标准饲料,饮用煮沸后冷却的自来水,换垫料 1 次/天,光照,12 h 光照/黑暗,照明时间 8:00-20:00。

1.2 方法

1.2.1 动物造模与分组 120 只大鼠分为假手术组(20 只)及模型组。模型组又分为 5 组:生理盐水对照组(对照组),雅盼低剂量药物组(低剂量组),雅盼中等剂量药物组(中剂量组),雅盼高剂量药物组(高剂量组),苯那普利组,每组各 20 只。

单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠模型制作:大鼠右侧卧位,备皮后常规消毒,3%戊巴比妥钠局部麻醉,取左侧背部肋下 5 mm 作切口,开腹,游离左肾及输尿管,取中上段结扎,之后逐层缝合。假手术组开腹后游离输尿管后即关腹。

1.2.2 给药方法 造模次日开始灌胃给药。假手术组与对照

组予生理盐水 5 mL 灌胃;雅盼提液低、中、高剂量组分别为 4.0、8.0、12.0 g/(kg·d);苯那普利组予苯那普利混悬液 5 mL/d 灌胃,其有效剂量为 0.467 mg/(kg·d),共 28 d。

1.2.3 标本采集与处理 各组大鼠治疗 28 d 后颈动脉取血,分离血清后送检;脱颈处死大鼠,取左肾组织,10%甲醛固定,磷酸盐缓冲液冲洗,二甲苯乙醇液脱水,石蜡包埋切片。

1.2.4 检测内容及方法

1.2.4.1 血清检测 尿酸酶法检测尿素氮(BUN)、苦味酸法检测肌酐(Scr)。

1.2.4.2 组织检测 肾组织石蜡切片后进行 HE 染色及 Masson 染色。HE 染色行常规显微镜检查,同时计算肾小管损伤指数(TII)。Masson 染色在 400 倍镜下,观察小管间质病变。TII:即半定量分析肾小管间质病变^[2]。每张切片随机选 10 个不含肾小球的视野,400 倍光镜下观察,由 3 个参数进行判断:蛋白管型和肾小管扩张、间质炎性细胞浸润、间质纤维化程度。每个参数按 0~3 分评价:0 分为正常;1 分为轻度,视野内损伤小于 25%;2 分为中度,视野内损伤 25%~50%;3 分为重度,视野内损伤大于 50%。TII 评分由肾脏所有视野的损伤等级评分加权平均计算而得。每个样本肾小管间质的评分为 0~9 分。

1.2.4.3 免疫组织化学检测 采用免疫组织化学法,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照染色,检测 TGF- β 1、Smad2、Smad7 的表达。每个观察指标在同一标本中制作切片 2 张,采用不加一抗的方法作阴性对照,同样也在每一组中作 2 张对照。出现黄褐色反应为阳性,相同部位不出现黄色反应为阴性。阳性等级判断指标:显色强度、阳性细胞数。显色强度有以下几种表达:无色、黄色、浅黄色、黄褐色。免疫组织化学结果以 Qwin550CW 型图像信号采集及分析系统进行灰度值测量。灰度值越高表明相应蛋白表达越低,反之则表明相应蛋白表达越高。

1.2.4.4 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 的表达 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 水平检测参照 ABI 试剂(SYBR Select Master Mix)RT-PCR 操作说明进行,ABI7500 荧光定量 PCR 仪器中进行,以 β -actin 为内参,运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据计算, $\Delta\Delta CT = (CT_{目的基因} - CT_{管家基因})_{实验组} - (CT_{目的基因} - CT_{管家基因})_{对照组}$ 。

1.2.4.5 Western blot 检测蛋白表达 Western blot 检测 Smad2 和 Smad7 蛋白。取 100 g 肾组织匀浆,取上清液,以 BCA 蛋白试剂盒检测匀浆液中蛋白浓度,将蛋白标本经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,TBST 室温封闭后与特异性的 Smad2(1:500)抗体和 Smad7(1:500)抗体共孵育,之后与辣

根过氧化物酶偶联的第二抗体作用、洗涤,最后 X 线片记录实验结果,计算机成像分析仪,测定 X 线片上杂交条带的吸光度值,代替蛋白表达量。全部试验均用 β -actin 作内参,以上每组操作重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 各组大鼠伤口愈合良好,无感染。模型组进食量明显少于假手术组,且鼠毛无光泽,同时耸毛、弓背、活动减少。雅盼各组及苯那普利组治疗后,进食有所恢复,但仍不及假手术组,活动较前增加;但鼠毛无明显变化。

实验期间,假手术组及高剂量组无死亡,生理盐水对照组死亡 2 只,中剂量组死亡 2 只,低剂量组及苯那普利组死亡 1 只。各组动物死亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 肾功能检测 造模后 28 d 模型组 BUN、Scr 与假手术组比较,明显增高($P < 0.05$);但经苯那普利及雅盼高、中、低剂量灌胃后 BUN、Scr 水平明显低于对照组($P < 0.05$);其中苯那普利组与高剂量组 BUN、Scr 低于中、低剂量组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 治疗后各组大鼠 Scr、BUN 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN(mmol/L)	Scr(μ mol/L)
假手术组	20	5.82 \pm 0.71	105.40 \pm 6.97
对照组	18	15.67 \pm 1.02*	137.80 \pm 9.10*
苯那普利组	19	9.74 \pm 1.25* Δ	112.61 \pm 5.59* Δ
高剂量组	20	9.82 \pm 1.41* Δ	119.35 \pm 5.87* Δ
中剂量组	18	9.98 \pm 1.52* Δ	124.50 \pm 5.71* Δ
低剂量组	19	10.56 \pm 1.17* Δ	129.69 \pm 5.52* Δ

*: $P < 0.05$,与假手术组比较; Δ : $P < 0.05$,与对照组比较

2.3 肾组织病理改变 光镜下 HE 和 Masson 染色显示,假手术组大鼠肾小球正常,肾小管-间质轻微纤维化(面积小于 5%),未见炎性细胞浸润。UUO 各组大鼠肾小管上皮细胞空泡化,肾小管扩张明显,部分肾小管萎缩,排列紊乱,肾间质弥漫炎性细胞浸润,Masson 染色可见肾间质局灶性纤维化。雅盼各治疗组及苯那普利组,肾小管-间质炎性细胞浸润及肾间质纤维化程度较对照组有所减轻,尤以高剂量组及苯那普利组减轻明显(图 1~6)。TII 评分显示,UUO 大鼠 TII 评分显著高于假手术组($P < 0.05$),但与对照组相比高、中剂量组及苯那普利组 TII 评分明显改善($P > 0.05$),低剂量组与对照组相比 TII 评分有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 TII 评分、TGF- β 1、Smad2、Smad7 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TII 评分(分)	TGF- β 1 $^{\circ}$	Smad2 $^{\circ}$	Smad7 $^{\circ}$
假手术组	20	0.35 \pm 0.11	211.78 \pm 2.02	227.89 \pm 19.31	203.34 \pm 12.35
对照组	18	5.67 \pm 0.72*	136.76 \pm 1.98*	85.53 \pm 9.73*	99.33 \pm 10.02* Δ
苯那普利组	19	1.74 \pm 0.45* Δ	192.61 \pm 3.59* Δ	180.33 \pm 10.23* Δ	160.35 \pm 11.26* Δ
高剂量组	20	1.82 \pm 0.21* Δ	191.73 \pm 1.33* Δ	179.35 \pm 17.33* Δ	157.24 \pm 13.32* Δ
中剂量组	18	2.98 \pm 0.52* Δ	186.36 \pm 3.89* Δ	160.03 \pm 13.23* Δ	141.52 \pm 13.26* Δ
低剂量组	19	4.56 \pm 0.17*	169.45 \pm 2.06* Δ	142.33 \pm 12.33* Δ	110.15 \pm 15.16*

*: $P < 0.05$,与假手术组比较; Δ : $P < 0.05$,与对照组比较; $^{\circ}$:单位为灰度值

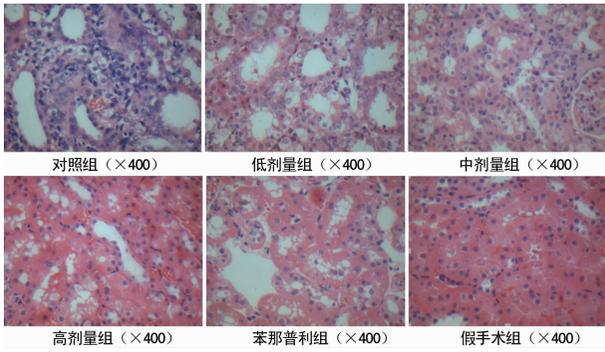


图 1 各组 HE 染色情况

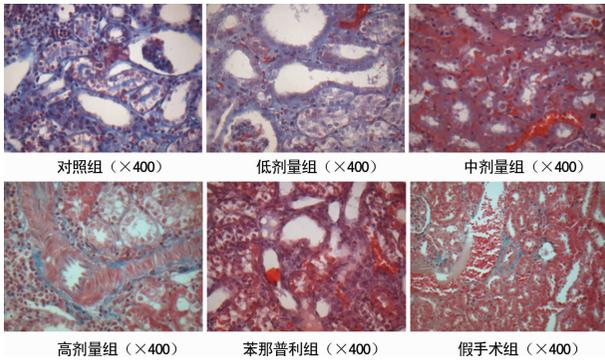


图 2 各组 Masson 染色情况

2.4 各组大鼠肾脏组织的免疫组织化学结果

2.4.1 TGF-β1 及 Smad2 mRNA 表达 假手术组肾组织肾小球和肾小管上皮细胞中无或弱阳性表达。模型组表现为褐色颗粒状沉积,着色较深,呈强阳性表达,主要集中在肾小管上皮细胞,肾小球也可见少量表达,假手术组与各模型组间的灰度值差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。低剂量组、中剂量组、高剂量组及苯那普利组之间有不同程度的阳性表达,但均低于对照组。见图 3、4。

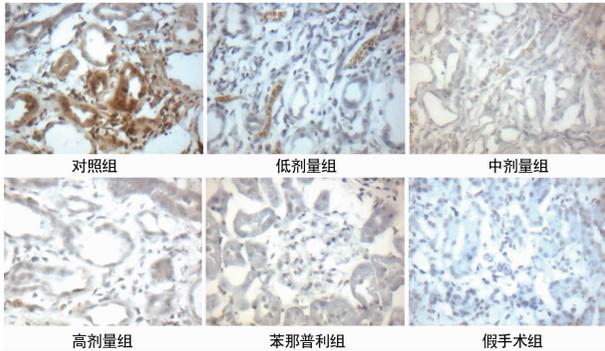


图 3 TGF-β1 在各组中的表达情况

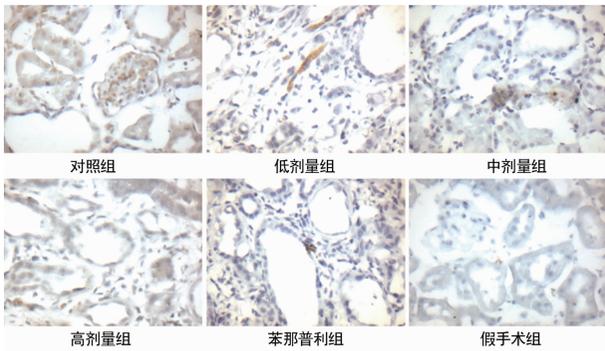


图 4 Smad2 在各组中的表达情况

2.4.2 Smad7 mRNA 的表达 假手术组 Smad7 mRNA 在肾小球着色部位广泛,呈棕黄色颗粒或块状,为强阳性表达,在肾小球的分布多于肾间质,主要见于毛细血管壁、肾小球系膜细胞和肾小球囊上皮细胞。各模型组 Smad7 mRNA 的表达有不同程度抑制,与假手术组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。高剂量组、中剂量组与苯那普利组表达抑制情况有所改善,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低剂量组较对照组相比表达有所增强,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

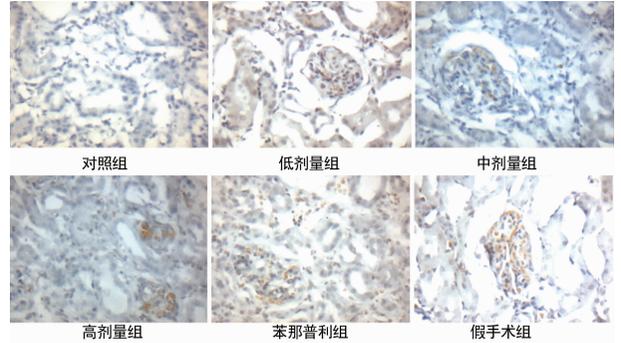
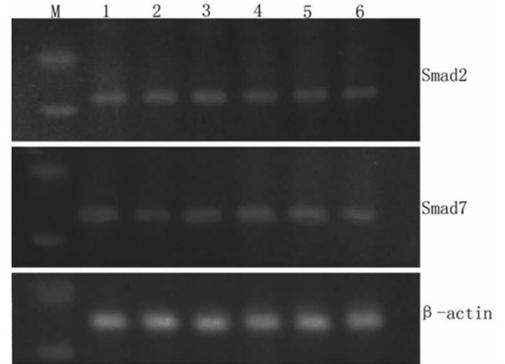


图 5 Smad7 在各组中的表达情况

2.4.3 Smad2 和 Smad7 Western blot 蛋白表达 见图 6。



M:Marker, D2000;1:假手术组;2:对照组;3:低浓度组;4:中浓度组;5:高浓度组;6:苯那普利组

图 6 Smad2、Smad7 与 β-actin 电泳图

3 讨论

肾间质纤维化是各种肾脏疾病发展至终末期肾衰竭的必经通路。大量研究证明,TGF-β1 是加速肾纤维化的最关键因素^[3]。TGF-β1 能加剧细胞外基质 (ECM) 的产生,对 ECM 基因表达、基质降解、细胞增殖分化、细胞凋亡及免疫功能都具有一定影响^[4],是导致肾小球硬化,肾小管-间质纤维化的重要因素^[5]。Smads 蛋白是 TGF-β 家族信号从受体到核的细胞内传导分子,调控细胞膜信号传导,在慢性肾纤维化中,起重要作用^[6-8]。Smad2 与 Smad3 同属受体激活型 Smad 蛋白 (R-Smad),二者具有 92% 的同源性^[9]。但有学者研究,大鼠敲除 Smad3 基因后,在 TGF-β1 刺激下,成纤维细胞依旧可以生成基质,显示 Smad2 是许多基质反应中的特异性调节因子^[10-11]。Smad7 属于细胞内 I 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白,它具有阻止 R-Smads 磷酸化及反馈调节 TGF-β 对靶基因转录的作用,是阻断肾组织 TGF-β1 效应的关键^[12-14]。已有不同学者对苯那普利延缓慢性肾衰竭病程进展方面的作用进行研究,结果均表明,该药确实能调节 TGF-β1/Smads 信号转导通路,

抑制肾间质纤维化^[15-16],故本研究中以此药作为西药对照。

UUO 是研究肾小管间质纤维化成熟的动物模型。本研究显示,UUO 大鼠肾间质炎性细胞浸润,肾小管扩张,坏死,空泡化,间质纤维化,符合慢性肾小管间质纤维化的特点。

傣药雅盼系蕨类卷柏科卷柏属植物。该药已有长期且较为广泛的运用,具有清热利湿,止咳止血,抗炎作用^[17]。而近年的研究提示该类药含有大量双黄酮类及阿魏酸棕榈酸-16-醇酯等成分,具有抗病毒、抗炎、抗氧化、抗血栓及扩张血管作用^[18-19]。本研究发现 UUO 模型组大鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad2 蛋白表达上调,而 Smad7 蛋白表达下调,TII 评分明显升高,肾功能明显下降,而经 28 d 干预后,雅盼低、中、高剂量组 TGF- β 1、Smad2 蛋白表达较对照组均有不同程度的下调,且差异有统计学意义($P < 0.05$),中、高剂量组 Smad7 蛋白表达有不同程度上调($P < 0.05$),而肾脏病理损伤程度较对照组有不同程度减轻:肾间质炎性细胞浸润、肾小管扩张,坏死及间质纤维化程度也有不同程度减轻,肾功能有所恢复,TII 评分明显减低,其中、高剂量组及苯那普利组 TII 评分减低程度优于低剂量组($P < 0.05$)。

综上所述,傣药雅盼中、高剂量治疗可以下调 TGF- β 1、Smad2 蛋白表达,上调 Smad7 蛋白表达,通过调节 TGF- β 1/Smads 信号转导通路,减轻 UUO 大鼠术后肾脏病变,延缓肾小管损伤及肾纤维化进展。

参考文献

[1] Li J,Zhang ZW,Wang DR,et al. TGF-beta 1/Smads signaling stimulates renal interstitial fibrosis in experimental AAN[J]. J Recept Signal Transduct Res,2009,29(5):280-285.

[2] Goumenos DS,Tsamandas AC,Nahas AM,et al. Apoptosis and myofibroblast expression in human glomerular disease: a possible link with transforming growth- β 1 [J]. Nephron,2002,92(2):287-296.

[3] Bottinger EP. TGF- β 1 in renal injury and disease[J]. Semin Nephrol,2007,27(3):309-320.

[4] 李彧,陈朝青,李亚东,等. 姜黄素对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化及 TGF- β /Smads 信号转导途径的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(9):1224-1228.

[5] Kalman JM,Kumar S,Sander P. Markers of collagen synthesis,atrial fibrosis,and the mechanisms underlying atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol,2012,60(18):1807-1808.

[6] Leask A,Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response[J]. Faseb J,2004,18(6):816-827.

[7] 王伟铭,刘峰,陈楠. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂对大鼠肾成纤维细胞转化生长因子 β 1/Smad 信号途径的作用研究[J]. 中华医学杂志,2006,86(11):740-744.

[8] 武贵群,高翔,梅长林. TGF- β /smads 通路及肾脏纤维化研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012,13(5):459-461.

[9] 赵俊芳,刘成,刘成海. 转化生长因子 β 胞内信号转导与 Smads 蛋白[J]. 中国病理生理杂志,2002,18(3):321-325.

[10] Ashcroft GS,Yang X,Glick AB,et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response[J]. Nat Cell Biol,1999,1(5):260-266.

[11] Massague J,Wotton D. Transcriptional control by TGF- β /Smad signaling[J]. Embo J,2000,19(2):1745-1754.

[12] 武帅,郭兆安,于春江,等. 芪蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织 BMP-7 及 TGF- β /smads 信号传导通路的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2014,15(4):297-301.

[13] 胡志娟,李英,何伟,等. 苯那普利对糖尿病大鼠肾组织中 TGF- β 1 和 Smad7 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2005,6(10):569-572.

[14] 姚钢炼,宁宁,高登峰,等. 苯那普利对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏结缔组织生长因子表达的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版),2006,27(4):362-364.

[15] 卞保平,万英,陈蓉,等. 梗阻性肾病大鼠肾组织 periostin 的表达及意义[J]. 中华肾脏病杂志,2012,28(8):628-632.

[16] Niu HL,Nie L,Liu MD,et al. Benazepril affects integrin-linked kinase and smooth muscle α -actin expression in diabetic rat glomerulus and cultured mesangial cells[J]. BMC Nephrol,2014,15(2):135-138.

[17] 张丽霞,管艳红,马洁,等. 西双版纳民族民间习用药用蕨类植物[J]. 中国民族民间医药杂志,2004,11(6):342-343.

[18] 张艺轩,石熾. 卷柏属药用植物生物活性研究进展[J]. 中成药,2011,133(4):664-667.

[19] 武帅,郭兆安,于春江,等. 芪蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织 BMP-7 及 TGF- β /smads 信号传导通路的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2014,15(4):297-301.

(收稿日期:2017-03-24 修回日期:2017-06-12)

2018 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://www.cqyxzz.com> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-61965157。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!