

“清化固肾排毒颗粒”对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 Wnt4 和 TGF- β 1 表达的影响

吴小燕^{1,2} 李丽艳² 项协隆² 汪国敏^{1,2} 董飞侠^{1,2}

(1.浙江中医药大学第三临床医学院,浙江杭州 310000; 2.浙江中医药大学附属温州中医院,浙江温州 325000)

摘要 目的:观察清化固肾排毒颗粒对肾间质纤维化大鼠肾组织 Wnt4 和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达的影响,从而探讨其对肾间质纤维化的作用机制。方法:SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、洛丁新组及清化固肾排毒方高、中、低剂量组,除假手术组外,其余各组大鼠均采用单侧输尿管结扎手术方法(UUO)建立大鼠肾间质纤维化模型,术后各组分别予相应药物或生理盐水灌胃,每日 1 次。给药第 7、14、21 日后,各组大鼠禁食不禁水 1d,处死,取手术侧肾组织做病理检测,Masson 染色观察其病理变化,免疫组织化学染色检测 Wnt4 及 TGF- β 1 在肾间质的阳性染色表达。结果:经 Masson 染色后,模型组与各给药组大鼠肾组织胶原纤维蓝染部分较假手术组明显增多,肾纤维化程度显著加重;与模型组比较,清化固肾排毒方各剂量组和洛丁新组大鼠肾组织胶原纤维蓝染部分明显减少,肾纤维化程度相对减轻。免疫组化结果显示,清化固肾排毒方各剂量组和洛丁新组大鼠肾组织 Wnt4 及 TGF- β 1 阳性表达显著低于模型组($P<0.05$)。结论:清化固肾排毒颗粒能有效改善肾间质纤维化模型大鼠肾纤维化程度,其可能通过下调 Wnt4、TGF- β 1 改善肾功能,从而达到改善肾纤维化的作用。

关键词 肾纤维化 Wnt4 TGF- β 1 清化固肾排毒颗粒 输尿管梗阻 病理学 SD 大鼠 实验研究

中图分类号 R693.05 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)08-0075-04

肾纤维化是慢性肾脏病终末期的共同病理表现,其程度是反映肾功能下降及预后的重要指标。清化固肾排毒颗粒已经临床实践证明,治疗慢性肾脏病有较好的疗效^[1-2]。为探索其治疗机制,本研究制作肾纤维化大鼠模型,观察清化固肾排毒方对模型大鼠肾组织 Wnt4 和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的影响,现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 清化固肾排毒颗粒(药物组成:黄芪、山药、柴胡、白花蛇舌草、金钱草、大黄、白芥子)由江阴天江药业有限公司加工制作,取黄芪提取物 1.5g、柴胡提取物 1g、白花蛇舌草提取物 1g、山药提取物 1g、金钱草提取物 1g、大黄提取物 0.5g、白芥子提取物 1g,混合 30min 使均匀,干法制成 18~40 目的颗粒,辅料主要为麦糊精和乳糖(2:1)。洛丁新(盐酸贝安普利片),北京诺华制药提供,批号:12294563。Masson 染色试剂盒、PBS、柠檬酸缓冲液、DAB 显色试剂盒,由北京中杉金桥公司提供。

1.2 实验动物 健康清洁级雄性 SD 大鼠,体质量(190 $\pm$ 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002,于温州医科大学实验动物中心分笼饲养,人工光照,阴暗

各 12h,自由饮食。

2 实验方法

2.1 造模 大鼠麻醉后取右侧卧位固定,局部剃毛,从背部侧背部下 0.5cm 做切口,开腹,暴露左侧肾脏,游离肾脏及左侧输尿管,分别于约肾盂处和输尿管上段处双重结扎且不剪断,纳肾归原位后逐层缝合。最后通过观察上端结扎处上部输尿管扩张,下端结扎处下部输尿管塌陷从而判断梗阻成功。

2.2 分组与给药 造模成功的大鼠随机分为模型组、洛丁新组(1.6mg/kg)和清化固肾排毒方高(3.0g/kg)、中(1.5g/kg)、低(0.75g/kg)剂量组,每组 9 只,另随机选取 9 只健康大鼠作为假手术组(开腹后只分离出左侧输尿管,不结扎,其余步骤同造模步骤)。各给药组每日分别灌胃给予相应药物溶液,假手术组、模型组每日予生理盐水 10mL/kg 灌胃,直至实验结束。

2.3 取材 各组大鼠分别于给药第 7、14、21 天后,随机取 3 只,禁食不禁水 1d,处死,取左肾(梗阻侧),除去包膜,放出积水,迅速分切肾组织,将其中一份于中性福尔马林溶液中固定(24h 以内),其余组织生理盐水冲洗后迅速置于液氮中冻存,转置-80℃冰箱中保存。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY14H270001);浙江省 151 人才专项;温州市 551 人才专项;温州市高层次人才课题资助

2.4 指标观察

2.4.1 病理观察 各组大鼠肾组织石蜡包埋切片后,行 Masson 染色,先后滴加 Masson 复合染色液、磷钼酸、苯胺蓝,分化液 95%酒精、无水酒精脱水,透明,封固。于 400 倍光镜下观察肾组织的病理改变。每张切片随机选取 5 个不相重叠的视野(肾小球及小血管除外),蓝色为纤维化阳性染色区,测量每个视野中阳性染色的相对面积,取其平均值。使用 Image Pro plus 图像分析软件对采集的图像进行平均面积分析。

2.4.2 免疫组化 将石蜡切片脱蜡和水化,PBS 冲洗 3 次后,加双氧水孵育 20min(室温),随后抗原修复。一抗 Wnt4 浓度为 1:500,TGF- β 1 浓度为 1:200。使用聚合 HRP 标记的二抗置于湿盒中孵育,应用 DAB 显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。在 400 倍光镜下观察,其中棕黄色部分为阳性染色。避开边缘及组织,每张切片随机选取 6 个非重叠视野,使用 Image Pro Plus 软件对图像进行分析,阳性细胞内的染色量化为综合面积和灰度值所得出的积分光密度值(OD 值),取其平均值进行统计分析。

2.5 统计学方法 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,多组间采用单因素方差分析,组间比较采用多样本均数间两两比较,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 实验结果

3.1 肾脏组织病理检查

Masson 染色于光镜下显示,假手术组大鼠有微量的蓝色染色组织,并没有明显的病理变化;模型组大鼠肾组织可以见到大量的蓝色胶原纤维,并且随着梗死时间的延长,蓝色胶原纤维呈现明显增多的趋势,说明肾纤维化的程度是进行性加重的。与假手术组比较,各给药组大鼠肾组织蓝色胶原纤维均有所增加;与模型组比较,洛丁新组和清化固肾排毒方各剂量组大鼠肾组织蓝色胶原纤维均较少,说明肾组织纤维化程度降低。见图 1。

3.2 各组大鼠 Wnt4 和 TGF- β 1 表达比较

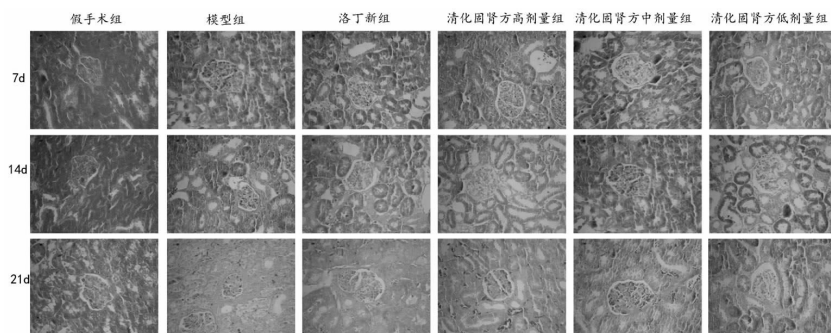
3.2.1 Wnt4 阳性表达 假手术组大鼠肾组织中可见少量 Wnt4

表达。模型组与各给药组各时段肾组织 Wnt4 表达均明显高于假手术组($P < 0.05$),且呈持续升高趋势;治疗第 14 日、第 21 日,各给药组大鼠肾组织 Wnt4 表达均明显低于模型组($P < 0.05$),各给药组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、图 2。

3.2.2 各组大鼠 TGF- β 1 阳性表达水平比较 假手术组大鼠肾组织中可见微量 TGF- β 1 阳性表达。模型组与各给药组各时段肾组织 TGF- β 1 阳性表达均明显高于假手术组($P < 0.05$),且呈持续升高趋势;治疗第 14 日、第 21 日,各给药组大鼠肾组织 TGF- β 1 阳性表达均明显低于模型组($P < 0.05$)。见表 2、图 3。

4 讨论

大多数慢性肾脏病(包括原发性肾小球疾病、慢性肾盂肾炎、狼疮性肾炎和糖尿病肾病等)最终会导致肾纤维化,肾纤维化是慢性肾脏病进展到终末期的共同病理途径,可由炎症、损伤等因素产生的细胞因子过度表达或者相关信号通路参与下发生。其中,Wnt 信号通路、TGF- β 1/smad 信号通路在肾纤维化的发生发展中共同发挥重要作用。

图 1 各组大鼠各时段肾纤维化情况($\times 400$)表 1 各组大鼠各时段肾组织 Wnt4 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗第 7 日	治疗第 14 日	治疗第 21 日
假手术组	0.003 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.011	0.016 $\pm$ 0.022
模型组	0.171 $\pm$ 0.051*	0.249 $\pm$ 0.105*	0.319 $\pm$ 0.220*
洛丁新组	0.064 $\pm$ 0.036*	0.094 $\pm$ 0.047 Δ	0.110 $\pm$ 0.046 Δ
清化固肾排毒方高剂量组	0.086 $\pm$ 0.04*	0.099 $\pm$ 0.0352 Δ	0.132 $\pm$ 0.057 Δ
清化固肾排毒方中剂量组	0.102 $\pm$ 0.036*	0.126 $\pm$ 0.0355 Δ	0.153 $\pm$ 0.133 Δ
清化固肾排毒方低剂量组	0.106 $\pm$ 0.032*	0.147 $\pm$ 0.0486 Δ	0.130 $\pm$ 0.064 Δ

注:*与假手术组比较, $P < 0.05$; Δ 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

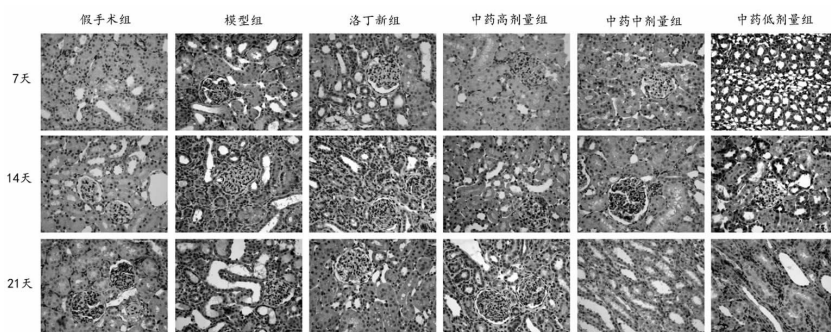
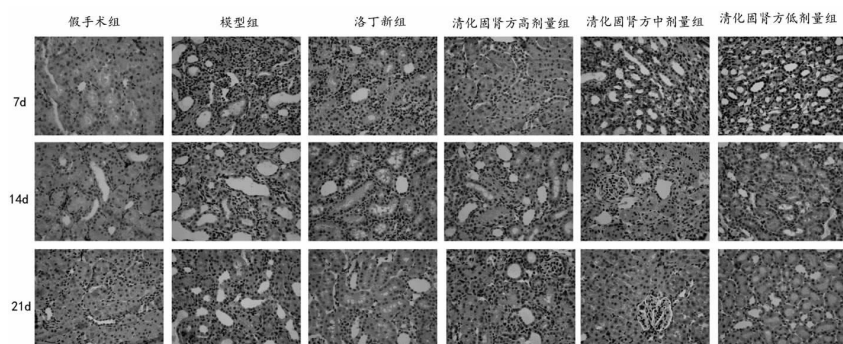
图 2 各组大鼠不同时段肾组织 Wnt4 表达(免疫组化染色, $\times 400$)

表2 各组大鼠不同时段肾组织 TGF- β 1 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗第7日	治疗第14日	治疗第21日
假手术组	0.027 $\pm$ 0.023	0.016 $\pm$ 0.010	0.031 $\pm$ 0.031
模型组	0.192 $\pm$ 0.058*	0.279 $\pm$ 0.154*	0.524 $\pm$ 0.226*
洛丁新组	0.095 $\pm$ 0.041*	0.137 $\pm$ 0.040 Δ	0.217 $\pm$ 0.057 Δ
清化固肾排毒高剂量组	0.112 $\pm$ 0.063*	0.151 $\pm$ 0.031 Δ	0.243 $\pm$ 0.075 Δ
清化固肾排毒中剂量组	0.117 $\pm$ 0.036*	0.186 $\pm$ 0.045 Δ $\diamond$	0.252 $\pm$ 0.085 Δ
清化固肾排毒低剂量组	0.132 $\pm$ 0.033*	0.175 $\pm$ 0.053 Δ	0.276 $\pm$ 0.135 Δ

注:*与假手术组比较, $P<0.05$; Δ 与模型组比较, $P<0.05$; $\diamond$ 与洛丁新组比较, $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠不同时段肾组织中 TGF- β 1 表达(免疫组化染色, $\times 400$)

Wnt 蛋白是一类分泌型糖蛋白,可通过自分泌或者旁分泌的方式激活膜受体从而发挥作用。目前已知有 19 种 Wnt 蛋白^[3],Wnt4 是其中之一。Wnt 信号通路正常情况下是沉默的,当其异常激活时,wnt 蛋白可出现异常表达^[4]。其中 Wnt4 结合经典通路和非经典通路的 Fz 受体参与了肾小管的形成^[5],Nguyen 等^[6]首次发现 Wnt4,且发现其在梗阻后 48h 出现表达,持续升高达 4 周。此外,Surendran 等^[7]通过建立 UUO 模型,发现 Wnt4 在集合管处有表达,并且在肌成纤维细胞表达水平明显增高。由此可推断,若 Wnt4 出现异常表达,肾组织可能也会随之发生异常变化。本研究发现,在输尿管梗阻 7d 后,造模大鼠肾组织均有 Wnt4 的阳性表达,这与文献报道相一致^[6],且 Wnt4 阳性表达随时间延长持续升高,明显高于同期假手术组,由此可说明 Wnt4 在肾纤维化过程中发挥着重要的作用。与模型组相比,洛丁新组与清化固肾排毒方各剂量组大鼠肾组织 Wnt4 均显著降低,这表明清化固肾排毒颗粒能下调 Wnt4 的表达,并有可能通过激活 Wnt 信号通路发生抗纤维化的作用。

有研究表明,TGF- β 1 通过激活其下游信号分子 Smad2/3,抑制 Smad7 来实现其调节肾纤维化的作用^[8]。TGF- β 1 能调节细胞的自我吞噬功能,诱发纤维细胞产生胶原、纤维连接蛋白,启动并调节上皮细胞向间充质细胞转化(EMT)的全过程,是肾纤维化过程的中心介导者和主要途径^[9-10]。有研究表明 TGF- β 1 在肾纤维化中的表达会增强,小鼠肾脏组织的肾纤维化程度与 TGF- β 1 的表达成正相关^[11],TGF- β 1 是肾纤维化发生、发展过程中的重要因子。本研究发现,造模后大鼠肾组织 TGF- β 1 阳性表达

显著高于假手术组,并且随着时间的延长而上调。经过洛丁新和清化固肾排毒方的治疗后,TGF- β 1 的阳性表达低于模型组,这说明清化固肾排毒方可能通过抑制 TGF- β 1 对肾纤维化产生拮抗作用,此前的文献也表明清化固肾排毒方可能是通过下调 TGF- β 1 蛋白水平的表达从而抗上皮细胞转分化的作用,最终达到拮抗肾纤维化的目的^[12],与本研究结果一致。

肾纤维化可归属于中医学“水肿”、“关格”、“癃闭”等范畴,其病机是由气虚、水湿、浊毒等因素致络脉气血运行失常,络脉瘀阻,日久化生痰瘀浊毒,最终可致肾络完全性闭塞,临床出现水肿、尿少、尿闭等症

状。治宜扶助正气、祛邪通络,清代名医叶天士提出“大凡络虚,通补最宜”。清化固肾排毒方是温州市中医院的自拟方,方中白芥子清化皮里膜外之痰,黄芪、山药健脾益气固肾,柴胡、白花蛇舌草、大黄清热解毒化瘀,全方共奏健脾益气、清热活血之功。

综上,清化固肾排毒颗粒可能通过下调 Wnt4 及 TGF- β 1 蛋白的表达水平达到拮抗肾纤维化的作用,但由于肾纤维化机制的复杂性,中药拮抗肾纤维化相关信号通路之间相互联系及共同发生作用的机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 董飞侠,朱宗元,曾章超.“清化固肾方”治疗慢性肾炎的临床研究[J].江苏中医药,2006,27(1):28.
- [2] 陈念昭,冯如流,陈春,等.清化固肾排毒方治疗慢性肾功能不全患者 45 例疗效观察[J].浙江中医杂志,2015,50(5):353.
- [3] CHIEN A J,CONRAD W H,MOON R T. A Wnt survival guide:from flies to human disease[J].J Invest Dermatol, 2009,129(7):1614.
- [4] POLAKIS P.Wnt signaling and cancer[J].Genes Dev, 2000,14(15):1837.
- [5] PARK J S,VALERIUS M T,MCAHON A P.Wnt β -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development[J].Development,2007,134(13):2533.
- [6] NGUYEN H T,THOMSON A A,KOGAN B A,et al. Expression of the Wnt gene family during late nephrogenesis and complete ureteral obstruction [J].Lab Invest,1999,79(6):647.
- [7] SURENDRAN K,SCHIAVI S,HRUSKA K A.Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction,and recombinant secreted frizzled-related protein4 alters the progression of renal

山楂叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激的影响

阚敏宸¹ 贺静芝¹ 苏 静²

(1.邯郸市中心医院,河北邯郸 056001; 2.邯郸市鸡泽县医院,河北邯郸 056000)

摘 要 目的:研究山楂叶总黄酮(HLF)对 2 型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激的影响。方法:大鼠采用高脂高糖饮食 8 周后腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法制备 2 型糖尿病大鼠模型。造模成功后的的大鼠随机分为模型组和 HLF 低(50mg/kg)、中(100mg/kg)、高(200mg/kg)剂量组,每组 16 只,另取 16 只正常大鼠作为正常组。各组大鼠分别灌胃给予相应药物或生理盐水,每日 1 次,疗程 6 周。干预结束后,测定各组大鼠空腹血糖水平,称量体重并计算睾丸指数,测定血清睾酮含量;取睾丸组织测定酸性磷酸酶(ACP)、乳酸脱氢酶(LDH)和谷氨酰转氨酶(γ -GT)含量;测定睾丸组织中抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)]活性和丙二醛(MDA)含量;末端标记法(TUNEL)观察睾丸组织细胞凋亡状况并计算凋亡指数(AI),Western blotting 法测定睾丸组织中 NF- κ B 蛋白表达。结果:与模型组比较,HLF 中、高剂量组大鼠空腹血糖水平显著降低,睾丸指数和血清睾酮含量显著升高,睾丸组织中 ACP、LDH、 γ -GT 含量显著升高,SOD、GSH-Px、CAT 活性均显著升高且 MDA 含量显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。模型组睾丸组织凋亡细胞数量较正常组明显增多,经 HLF 治疗后上述病理性变化和细胞凋亡状况均明显改善,其中以 HLF 高剂量组效果最为显著;与模型组比较,HLF 中、高剂量组 AI 显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),睾丸组织中 NF- κ B 蛋白表达量显著下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:HLF 具有抑制 2 型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激损伤的作用,从而起到保护 2 型糖尿病大鼠睾丸组织的作用。

关键词 山楂叶总黄酮 糖尿病 睾丸 氧化应激 SD 大鼠 雄性 实验研究

中图分类号 R587.105 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)08-0078-04

睾丸组织病变是糖尿病最常见的并发症之一,发病率是非糖尿病患者的 10 倍以上^[1],严重影响着患者的生活质量。山楂叶为我国传统中药品种,在《本草经疏》及《本草通玄》等典籍中均有记载。山楂叶总黄酮(Hawthorn leaves flavonoids,HLF)是指从山楂叶中提取的一类黄酮类化合物。以往的研究表明 HLF 具有抗氧化、降血脂等多种生物学活性^[2],周少英等^[3]和

张鹏等^[4]研究发现 HLF 能够通过抑制组织氧化应激损伤和细胞凋亡而起到保护 2 型糖尿病大鼠胰腺组织、脑组织等药理学作用,但 HLF 是否对 2 型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激损伤具有抑制作用尚未见文献报道。本实验通过制备 2 型糖尿病大鼠模型并灌胃给予 HLF 进行治疗,研究 HLF 对 2 型糖尿病大鼠睾丸组织应激损伤的影响,并探讨其可能的作用机制。

fibrosis[J].J Am Soc Nephrol,2005,16(8):2373.

[8] LAN H Y.Smard7 as a therapeutic agent for chronic kidney diseases[J].Front Biosci,2008,13:4984.

[9] DING Y,CHOI M E.Regulation of autophagy by TGF- β :emerging role in kidney fibrosis [J].Semin Nephrol,2014,34(1):62.

[10] RHYU D Y.Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J].Journal of the American Society of Nephrology,2005,16(3):667.

[11] SCHARPFENECKER M,FLOOT B,RUSSELL N S,et

al.The TGF- β co-receptor endoglin regulates macrophage infiltration and cytokine production in the irradiated mouse kidney[J].Radiother Oncol,2012,105(3):313.

[12] 罗婷,程锦国,简怡娟,等.清化固肾排毒方对 UUO 大鼠上皮细胞转分化的影响[J].上海中医药杂志,2015,49(11):71.

第一作者:吴小燕(1990—),女,硕士研究生,中西医结合肾病专业。

通讯作者:董飞侠,医学博士,主任中医师,教授,硕士研究生导师。cgfsfhtd@163.com

收稿日期:2016-05-10

编辑:吴 宁