

解毒复肾逐瘀方对肾纤维化大鼠 CTGF 及 TGF β_1 表达的影响

Effects of Jiedu Fushen Zhuyu fang on expression of CTGF and TGF β_1 in renal fibrosis rats

阮君山 王少明 严晓华 庄捷 周欢
(福建省立医院, 福建 福州, 350001)

中图分类号: R256.5 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2011) 17-0009-03 证型: DBG

【摘要】 目的: 研究解毒复肾逐瘀方对肾纤维化的干预作用机制。方法: 建立大鼠单侧输尿管结扎术 (UUO) 肾间质纤维化动物模型, 观察给予解毒复肾逐瘀方治疗后肾间质病理变化及肾组织转化生长因子 (TGF β_1) 及结缔组织生长因子 (CTGF) 表达的影响。结果: 解毒复肾逐瘀方能明显减少大鼠胶原沉积的面积含量。药物治疗组能抑制大鼠的 TGF β_1 及 CTGF 蛋白的表达。结论: 解毒复肾逐瘀方能减轻肾间质纤维化的损伤, 可能与抑制大鼠的 TGF β_1 及 CTGF 蛋白表达有关。

【关键词】 解毒复肾逐瘀方; CTGF; TGF β_1 ; 影响

【Abstract】 Objective: To study the intervention mechanism of Jiedu Fushen Zhuyu fang to renal fibrosis. Methods: To built renal fibrosis animal model by the rats with unilateral ureteral ligation (UUO), observed the effect of Jiedu Fushen Zhuyu fang on expression of pathological changes in renal interstitial, transforming growth factor (TGF β_1), connective tissue growth factor (CTGF). Results: Jiedu Fushen Zhuyu fang can significantly reduce the collagen deposition area content of rats. Drug treatment group can inhibit the expression of TGF β_1 and CTGF protein of rats. Conclusion: Jiedu Fushen Zhuyu fang can reduce the damage of renal interstitial fibrosis, which may inhibit the expression of TGF β_1 and CTGF protein.

【Keywords】 Jiedu Fushen Zhuyu fang; CTGF; TGF β_1 ; Effect

肾纤维化是各种慢性肾脏疾病进展为终末期肾衰竭的关键途径, 研究表明这一过程可以被逆转, 肾纤维化的早期干预, 对慢性肾脏疾病的防治具有重要意义^[1]。福建省立医院中医科在长期临床实践总结出个治疗慢性肾脏病的有效方剂, 解毒复肾逐瘀方并在大量的临床应用中取得了良好效果^[2-4]。本文通过大鼠单侧输尿管结扎术 (UUO) 建立肾间质纤维化动物模型, 观察解毒复肾逐瘀方的治疗效果, 以研究解毒复肾逐瘀方对肾间质纤维化的可能机制。

1 材料与方

1.1 药物与试剂

解毒复肾逐瘀方, 由福建省立医院中医科提供处方深圳三九现代中药有限公司加工成中药免煎颗粒备用, 临用前用生理盐水稀释。兔抗人 CTGF、兔抗人 TGF β_1 抗体, SANTACRUZ; DAB 染色试剂, 福州迈新。

1.2 实验动物

清洁级 SD 大鼠 48 只, 雄性, 体重 200~250g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司饲养于福建省立医院实验动物中心, 清洁级饲养。

1.3 动物模型建立及分组

参照文献^[5], 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和解毒复肾逐瘀方治疗高低剂量组, 每组 12 只。采用单侧输尿管

结扎术建立模型。造模大鼠行手术结扎左侧输尿管近肾盂段, 假手术组行手术分离但不结扎左侧输尿管。解毒复肾逐瘀方治疗组在造模同时灌喂解毒复肾逐瘀方水溶液, 灌胃量为 1、3g (生药量)/kg 大鼠体重, 灌胃体积 10ml/kg, 临用时配制。模型组和假手术组分别灌胃等体积生理盐水。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 生化检测于术后第 14 天腹主动脉取血, 全自动生化分析仪 (日立 7170A) 测定解毒复肾逐瘀方对模型大鼠血清肌酐 (Scr) 及血尿素氮 (BUN) 的影响。

1.4.2 病理检测术后第 3、7、14 天处死大鼠, 取肾组织石蜡包埋, 常规制片行 HE 染色和 Masson 染色, 光镜下观察解毒复肾逐瘀方对模型大鼠的肾小管和肾间质病变的影响。运用 imageJ 软件计算胶原沉积面积, 并进行比较。

1.4.3 免疫组化检测用 SABC 法检测肾间质组织中的 CTGF 及 TGF β_1 的表达。

1.5 统计学方法

所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 组间差异性比较采用单因素方差分析进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 对肾功能的影响

UUO 术后 14d, 模型组血清 BUN 较同期假手术组显著增

高 ($P<0.01$), 而解毒复肾逐瘀方组的血清 BUN 低于同期模型组 ($P<0.01$), 且有剂量依赖性; 模型组术后 14d 与同期假手术组比较, 血清 Scr 有明显增高 ($P<0.01$), 解毒复肾逐瘀方组的血清 Scr 低于同期模型组 ($P<0.01$)。

2.2 对大鼠肾组织病理变化的影响

模型组术后 14d 肾间质中大量单核与淋巴细胞浸润明显, 细胞增殖明显; 部分肾小管明显扩张, 部分小管则出现萎缩消失, 纤维化明显, 肾皮质变薄, 肾间质开始增宽, 基底膜增厚明显可见间质细胞增多, 胶原成分增加, 部分小管消失, 集合管、远端小管扩张成囊状, 肾小管萎缩或坏死, 管腔闭塞或扩

张并开始出现纤维化。与同期模型组比较, 解毒复肾逐瘀方组光镜下见肾间质稍增宽, 炎性细胞浸润减轻, 基底膜病变轻于模型组。与假手术组相比较, 模型组在第 3 天时, 可见间质细胞增多, 胶原成分增加 ($P<0.01$), 在第 7 天部分小管消失, 集合管、远端小管扩张成囊状, 第 14 天肾小管萎缩或坏死, 管腔闭塞或扩张并开始出现纤维化这种变化更为显著 ($P<0.01$)。给药组跟模型组比较 3 天、7 天和 14 天纤维化程度明显减轻 ($P<0.01$)。解毒复肾逐瘀方组能够改善肾间质的纤维化程度。

各组肾小管间质胶原染色面积比%, 详见表 1。

表 1 各组肾小管间质胶原染色面积比% ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	第 3 天 (n=3)	第 7 天 (n=3)	第 14 天 (n=6)
假手术组	-	2.35±1.26	4.05±1.35	7.54±1.98
模型组	-	9.64±1.95 ^{##}	22.36±2.01 ^{##}	41.10±2.31 ^{##}
解毒复肾逐瘀方组	3g/kg	7.25±1.33 ^{**}	19.64±2.75 [*]	39.63±3.25 [*]
	1g/kg	7.99±1.27 ^{**}	20.15±3.01 [*]	40.23±2.17 [*]

注: 与假手术比较^{##} $P<0.01$; 与模型组比较^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

2.3 对大鼠肾组织 TGFβ₁ 及 CTGF 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示模型组大鼠肾组织 TGFβ₁ 及 CTGF 蛋白水平较同期假手术组明显升高; 解毒复肾逐瘀方组用药后 2 周,

与模型组比较 TGFβ₁ 及 CTGF 蛋白表达水平明显降低。

解毒复肾逐瘀方对大鼠肾间质 CTGF 表达的影响和解毒复肾逐瘀方对大鼠肾间质 TGFβ₁ 表达的影响详见图 1、图 2。

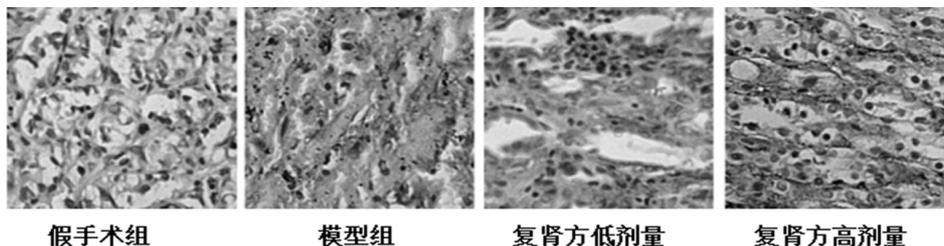


图 1 解毒复肾逐瘀方对大鼠肾间质 CTGF 表达的影响

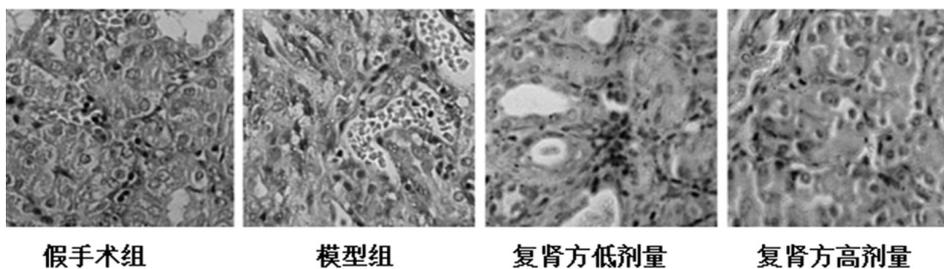


图 2 解毒复肾逐瘀方对大鼠肾间质 TGFβ₁ 表达的影响

3 讨论

肾纤维化是一个进行性的过程, 最终导致终末期肾衰竭, 需透析或肾移植治疗, 故研究具有抗肾纤维化的药物是国内外许多学者共同关注的焦点^[6-7]。省立医院的临床实践认为, 肾纤维化病理改变出现, 最终发展慢性肾衰竭, 其病理基础在于脾肾两虚, 最主要病因病机是本虚标实。脾肾两虚为本虚, 而湿浊、湿热、瘀血则为标实。基于上述中医病机特点, 福建省立医院中医科在长期临床实践总结出了一个治疗慢性肾脏病的有效方剂: 解毒复肾逐瘀方, 方中运用黄芪、党参为君药益气

健脾补肾, 以后天养先天; 丹参、赤芍、路路通、川芎、山茱萸、车前子、牛膝、石苇为臣, 其中山茱萸、车前子、牛膝、石苇清淡补肾, 利水化湿; 丹参、赤芍、路路通、川芎活血化瘀通络, 兼顾标症; 佐以白花蛇舌草清热解毒, 大黄去瘀生新。在大量的临床应用中取得了良好效果^[2-4]。

肾纤维化的病理学基础为细胞外基质合成增加, 降解减少, 导致胶原过度沉积。CTGF 的表达上调是肾纤维化发生的中心环节^[8-9], CTGF 的上调可以导致多种生理病理效应, 一方面其可以导致 MMPs/TIMPs 失衡使得细胞外基质合成和降解

的平衡被打破^[10], 另一方面 CTGF 可以促进胶原的合成, 综合效应使得 ECM 过多积聚出现肾间质纤维化^[11]。CTGF 的合成和表达受到多种细胞因子如血小板衍生生长因子 (PDGF)、TGF β_1 、白细胞介素 1 (IL-1) 等调控, 其中以 TGF β_1 的信号调控最为强烈, 能促进, CTGF 的大量合成, 抑制 ECM 的降解, 从而促进肾纤维化不断进展^[11-12]。本实验选用解毒复肾逐瘀方干预 UUO 大鼠, 研究结果显示, 模型对照组肾组织的 TGF β_1 表达量高于假手术对照组 ($P < 0.01$), 采用药物干预后, 复肾方低剂量组和高剂量组肾组织中 TGF β_1 和 CTGF 的表达量均明显降低。提示复肾方可能通过抑制 TGF β_1 的产生, 减少 CTGF 的合成, 抑制 ECM 的沉积, 从而达到预防和治疗肾纤维化的作用。

参考文献:

- [1] Farris AB, Adams CD, Brousaides N, et al. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1): 176
- [2] 严晓华, 金一顺, 蓝健姿, 等. 解毒通瘀复肾汤联合贝那普利对系膜增生性肾炎患者小管性蛋白尿的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, (02): 161
- [3] 蓝健姿, 严晓华, 阮诗玮, 等. 解毒通瘀复肾汤对慢性肾炎尿结缔组织生长因子水平的影响[J]. 福建中医药大学学报, 2010, (06): 13
- [4] 张凤玲, 严晓华. 原发性肾小球疾病气阴两虚证中西医研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2010, (02): 84
- [5] 冯媛, 刘敏, 张苗, 等. 黄蜀葵花总黄酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, (11): 1006
- [6] Eswaran S, Adhikari AV, Pal NK, et al. Design and synthesis of some new qui-

- noline-3-carbohydrazone derivatives as potential antimycobacterial agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(3): 1040
- [7] Liu L, Xu Y, Shea C, et al. Radiosynthesis and bioimaging of the tuberculosis chemotherapeutics isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in baboons[J]. J Med Chem, 2010, 53(7): 2882
- [8] 王波, 戴小华. 干预 CTGF 在防治高血压早期肾损害肾脏纤维化中的价值[J]. 安徽医药, 2011, (05): 535
- [9] 钱明, 甘卫华, 陈荣华. 肾纤维化进程中的结缔组织生长因子信号[J]. 国际儿科学杂志, 2006, (04): 275
- [10] Wang X, Zhou Y, Tan R, et al. Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. Am J Physiol -ol Renal Physiol, 2010, 299(5): F973
- [11] Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819
- [12] Yuan Q, Wang R, Peng Y, et al. Fluorofenidone Attenuates Tubulointerstitial Fibrosis by Inhibiting TGF-beta(1)-Induced Fibroblast Activation[J]. Am J Nephrol, 2011, 34(2): 181

基金项目:

福建省中医药重点项目资助。

作者简介:

阮君山 (1976-), 男, 福建省立医院药剂科主管药师, 南京中医药大学博士研究生在读, 研究方向: 中药干预肾纤维化机制研究。

编号: ER-11082601 (修回: 2011-09-06)

中医临床基地首期科研培训启动 千名临床人员参加, 培养 200 名学科带头人

8月26日, 国家中医药管理局科技司主办、北京中医药大学循证医学中心和中国中医药科技开发交流中心协办的第一期国家中医临床研究基地临床科研人员能力培训在京启动。国家中医药局还将于今年10月、12月分别在河南郑州、浙江杭州举办第二期和第三期基地临床科研人员能力培训, 参加培训的中医临床科研人员将不少于1000人。

国家中医药局科技司副司长李昱介绍, 临床科研人才能力的培养, 是今后一段时间国家中医临床研究基地建设重点工作之一。科技司要求参加培训的1000名临床人员中, 80%的人员掌握临床科研基本知识和技能, 20%的培训人员掌握临床科研立项、设计、实施, 达到学科带头人的基本要求。

国家中医药管理局为本次培训特邀中国工程院院士王永炎教授、北京大学詹思延教授、北京中医药大学循证医学中心刘建平教授、江苏省中医院熊宁宁教授、广东省中医院吕玉波院长等17位专家, 围绕“十二五”中医药科技规划、中医药科技管理及基地科研管理模式、中医临床研究的选题与实践、临床试验研究的设计与注册、中医临床研究中的伦理学问题、临床科研经费的预算执行与监管、临床科研成果的转化与推广等主题, 全面讲授临床研究基地建设所需的知识技能。各临床研究基地及相关中医科研院所业务分管领导、科研管理人员、课题负责人和临床科研骨干等300多人参加了培训。

(陈军//中国中医药报)