

益气活血中药对肾间质纤维化大鼠转化生长因子- β 、Smad2 和 Smad3 表达的影响

刘咏梅¹, 刘文军¹, 王文娟², 刘丽², 刘瑞华¹, 吴志奎¹, 陈玉英¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 首都医科大学, 北京 100069)

【摘要】 目的 探讨益气活血中药对肾间质纤维化大鼠转化生长因子- β (TGF- β)、Smad2 和 Smad3 表达的影响。方法 将 36 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、西药对照组及中药大、中、小剂量组, 每组 6 只。采用单侧输尿管结扎术建立肾间质纤维化动物模型。西药对照组及中药大、中、小剂量组于术前 2 d 灌胃福辛普利钠($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)及中药提取液($7.2, 3.6, 1.8 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)各 2 ml; 假手术组和模型组给予等量生理盐水。各组于术后 3 周处死大鼠取肾组织, 用实时聚合酶链反应(real-time PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的 mRNA 和蛋白表达。结果 模型组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的 mRNA 和蛋白表达较假手术组均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 益气活血中药各剂量组可以明显抑制模型大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的 mRNA 和蛋白表达, 其中除中药小剂量组对 Smad3 mRNA 的抑制作用较大、中剂量组明显降低外(均 $P < 0.05$), 其余指标各剂量组间比较差异均无统计学意义。结论 益气活血中药可能通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路中 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 等表达起到治疗作用。

【关键词】 益气活血; 肾间质纤维化; 转化生长因子- β ; Smad2; Smad3

中图分类号: R285.5; R256.5 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.003

Effects of Chinese medicine for invigorating qi and promoting blood circulation (益气活血) on the expressions of transforming growth factor- β , Smad2 and Smad3 in rats with renal interstitial fibrosis LIU Yong-mei*, LIU Wen-jun, WANG Wen-juan, LIU Li, LIU Rui-hua, WU Zhi-kui, CHEN Yu-ying. * Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Traditional Medicine, Beijing 100053, China
Corresponding author: LIU Wen-jun, Email: liuwenjunlyzh@263.net

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of Chinese medicine for invigorating qi and promoting blood circulation (益气活血), Yiqi Huoxue formula (YQHXF, 益气活血方), on the expressions of transforming growth factor- β (TGF- β), Smad2 and Smad3 in rats with renal interstitial fibrosis. **Methods** Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into six groups: sham operation group, model group, western medicine control group, high-dose, medium-dose and low-dose YQHXF groups (each, $n = 6$). Unilateral ligation of ureter was carried out to establish the rat model of renal interstitial fibrosis. Two days before the operation, intragastrically, fosinopril sodium ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was given to the western medicine control group, and 2 ml of each of the following doses of YQHXF: $7.2, 3.6, 1.8 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was administered into the high, medium and low dosage groups, respectively. Sham operation group and model group received the same amount of normal saline with the same method. All rats were administered with corresponding drugs for 3 weeks. After the last administration, the animal was sacrificed and its kidney tissue was taken out, the mRNA and protein expressions of TGF- β , Smad2, Smad3 were measured by the real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting. **Results** The mRNA and protein expressions of TGF- β , Smad2 and Smad3 in model group were higher than those in sham operation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), YQHXF treatment could down-regulate the mRNA and protein expressions of TGF- β , Smad2 and Smad3, and in low-dose YQHXF group, the down-regulation of Smad3 mRNA was more obvious than that in high and medium dosage groups (both $P < 0.05$). No significant difference in effect on other indexes was observed among the three YQHXF groups. **Conclusion** YQHXF might play a role in the treatment of renal interstitial fibrosis via inhibiting the mRNA and protein expressions of TGF- β , Smad2 and Smad3 in the TGF- β /Smad signaling transduction pathway.

【Key words】 Yiqi Huoxue formula; Renal interstitial fibrosis; Transforming growth factor- β ; Smad2; Smad3

肾间质纤维化表现为肾小管萎缩和消失, 肾间质淋巴和单核细胞浸润及纤维组织增生, 许多证据

显示转化生长因子- β (TGF- β)是肾脏纤维化发生发展中的关键因子^[1], Smad 蛋白是目前所知惟一的 TGF- β 受体胞内激酶底物, 介导了 TGF- β 的胞内信号转导, 以 Smad 信号通路为靶目标阻断这一过程可能会提供一种新的治疗肾纤维化的手段。赵爱青等^[2]研究显示, 中药姜黄素可以通过干预肾间质纤维化大鼠肾组织 TGF- β 1 的上调而减轻肾间质纤维

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873251); 北京市自然科学基金资助项目(7062057)

通信作者: 刘文军, Email: liuwenjunlyzh@263.net

作者简介: 刘咏梅(1967-), 女(汉族), 山东省人, 医学博士, 副研究员。

化。孙元莹等^[3]研究也显示,采用黄芪、坤草、丹参、枸杞等组成的益肾康治疗糖尿病肾病大鼠,可以通过下调肾组织 TGF- β 1 的表达,减少肾组织中细胞外基质(ECM)沉积,从而减轻肾间质纤维化。临床观察发现,由黄芪、当归、川芎、赤芍、丹参等中药组成的益气活血方剂,可以益气活血、健脾利水,保护肾功能。本研究中以大鼠单侧输尿管结扎术(UUO)建立肾间质纤维化动物模型,观察益气活血法对肾间质纤维化大鼠肾脏 TGF- β /Smad 通路中 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 表达的影响,探讨益气活血法在抗肾间质纤维化中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 180~200 g,由中国医学科学院实验动物中心提供(许可证号:SCXK-京-2005-0013)。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、西药对照组及中药大、中、小剂量组,每组 6 只。自由进食和饮水,适应性饲养 1 周。实验过程中动物处置方法符合动物伦理学要求。

1.2 实验药物及主要试剂:福辛普利钠(商品名:蒙诺,购于中美上海施贵宝制药有限公司,批号:0607088);益气活血法中药提取液(生黄芪 15 g,当归 10 g,赤芍 10 g,白芍 10 g,丹参 30 g,黄芩 10 g,车前草 15 g,牛膝 15 g 等)经水提醇沉得 4.4 kg/L 生药提取液,由本院制剂室提供。TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自美国 MBI 公司;SYBR Green 荧光染料试剂购自美国应用生物公司;Smad2、Smad3、TGF- β 及 β -肌动蛋白(β -actin)引物序列由北京赛百盛基因技术有限公司合成,引物序列见表 1。Smad2、Smad3、TGF- β 及 β -actin 羊抗兔单克隆抗体均为美国 Santa Cruz 产品;Bradford 蛋白浓度测定试剂购自北京天根生化科技有限公司。

表 1 real-time PCR 引物序列

基因	Genebank 检索号	引物序列	扩增产物大小(bp)
β -actin	M10277	上游:5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'	211
		下游:5'-AATGTCTACGCACGATTTC-3'	
TGF- β	NM_021578	上游:5'-CAACAATTCTGGCGTTACC-3'	200
		下游:5'-TGGGACTGATCCCATTTGATT-3'	
Smad2	NM_019191	上游:5'-AGTCAAAACCCAGAGCGAAA-3'	166
		下游:5'-TTATGCCCAACGAGACATCA-3'	
Smad3	NM_013095	上游:5'-TGGGATGTACAGTCCAAAA-3'	221
		下游:5'-GAAGAAGCGTTCTCACCAG-3'	

注:real-time PCR;实时聚合酶链反应

1.3 模型制作及分组给药:采用 UUO 制备大鼠肾小管间质纤维化模型。用 2%戊巴比妥 40 mg/kg 腹

腔注射麻醉大鼠,固定、去毛备皮,开腹结扎左侧输尿管后缝合,关腹;假手术组仅分离左侧输尿管、不结扎。西药对照组及中药大、中、小剂量组分别于术前 2 d 灌胃福辛普利钠 10 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹(相当于人剂量的 20 倍)或 7.2、3.6、1.8 ml $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹中药提取液(分别为人服用量的 20、10、5 倍),均用生理盐水补充至 2 ml,每日 1 次,连续 3 周。假手术组及模型组灌胃等量生理盐水。

1.4 观察指标及检测方法:各组分别于术后 3 周处死大鼠,灌流左侧肾脏,取约 100 mg 肾组织,加 TRIzol 试剂于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.1 采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肾组织 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的蛋白表达:提取大鼠肾组织总蛋白质,采用 Bradford 比色法测定蛋白质浓度。取等量蛋白经 15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用含 10%脱脂奶粉的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBS)室温封闭 1 h,然后加入一抗工作液(1:2 000 稀释),室温平缓摇动 1 h,4 $^{\circ}$ C 过夜;用含吐温 20 的 TBS 缓冲液(TBST)室温洗膜 10 min,共 2 次;加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗工作液(1:2 000, TBST 稀释),室温平缓摇动孵育 1 h;TBST 室温洗膜 10 min,共 2 次;化学发光试剂(ECL)各取 0.5 ml 混合后显色 1 min,置入暗匣中,显影 1~5 min,定影 1 min,冲洗,晾干。采用图像分析系统扫描确定 X 线片上杂交条带的 A 值。

1.4.2 real-time PCR 检测肾组织 TGF- β 、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达:按照 TRIzol 试剂说明书提取肾组织总 RNA,紫外分光光度计测定波长为 280 nm 和 260 nm 处吸光度值(A_{280} 、 A_{260}),定量并检测其纯度,提取的总 RNA 用 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定;将 RNA 逆转录为 cDNA;PCR 反应体系:cDNA 1 μ l,上、下游引物各 1 μ l,2 $\times$ SYBR Green 荧光染料试剂 10 μ l,加焦碳酸二乙酯(DEPC)水至 20 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 8 min。琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。根据双标准曲线法,以目的基因与 β -actin 基因 mRNA 水平比值作为目的基因 mRNA 的相对表达量^[4]。

1.5 统计学方法:采用 SPSS 11.0 软件,计量资料用均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2、Smad3 的蛋白表达比较(表 2;图 1):模型组大鼠肾皮质 TGF- β 、Smad2、Smad3 的蛋白表达均较假手术组显著升高(均 $P<0.01$);益气活血中药大剂量组能明显抑制模型大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2、Smad3 的蛋白表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而各剂量组间比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。西药对照组可明显抑制 TGF- β 、Smad2 的蛋白表达,而对 Smad3 蛋白无显著抑制作用。

表 2 各组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2、Smad3 的蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TGF- β 蛋白	Smad2 蛋白	Smad3 蛋白
假手术组	6	0.67 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.09
模型组	6	1.83 $\pm$ 0.34 ^b	1.20 $\pm$ 0.32 ^b	0.71 $\pm$ 0.18 ^b
西药对照组	6	0.72 $\pm$ 0.10 ^d	0.27 $\pm$ 0.09 ^d	0.54 $\pm$ 0.11
中药大剂量组	6	0.94 $\pm$ 0.11 ^{df}	0.42 $\pm$ 0.12 ^{df}	0.47 $\pm$ 0.09 ^c
中药中剂量组	6	1.34 $\pm$ 0.31 ^f	0.70 $\pm$ 0.20 ^{cd}	0.58 $\pm$ 0.12
中药小剂量组	6	1.47 $\pm$ 0.23 ^f	0.92 $\pm$ 0.18 ^f	0.67 $\pm$ 0.15

注:与假手术组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,

^d $P<0.01$;与西药对照组比较,^f $P<0.01$

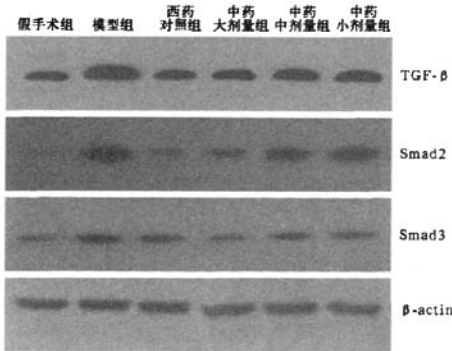


图 1 Western blotting 检测各组大鼠 TGF- β 、Smad2、Smad3 的蛋白表达

2.2 各组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达比较(表 3;图 2):模型组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的 mRNA 表达均较假手

术组明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);益气活血中药可明显抑制模型大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的 mRNA 表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而各剂量组间除小剂量组 Smad3 mRNA 表达较大、中剂量组明显降低外(均 $P<0.05$),其余各剂量组间指标比较差异无统计学意义。西药对照组可明显抑制 Smad3 mRNA 表达,而对 TGF- β 、Smad2 的抑制作用不明显。

表 3 各组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TGF- β mRNA	Smad2 mRNA	Smad3 mRNA
假手术组	6	5.16 $\pm$ 0.72	7.90 $\pm$ 1.71	6.76 $\pm$ 0.97
模型组	6	8.35 $\pm$ 3.01 ^a	15.69 $\pm$ 7.38 ^a	8.81 $\pm$ 0.98 ^b
西药对照组	6	5.05 $\pm$ 2.05	15.89 $\pm$ 6.55	5.51 $\pm$ 1.03 ^d
中药大剂量组	6	3.54 $\pm$ 1.34 ^d	9.85 $\pm$ 4.29	4.18 $\pm$ 1.12 ^d
中药中剂量组	6	3.02 $\pm$ 0.47 ^{de}	7.40 $\pm$ 0.93 ^{ce}	5.82 $\pm$ 1.73 ^d
中药小剂量组	6	4.03 $\pm$ 1.48 ^c	7.33 $\pm$ 2.55 ^{ce}	2.62 $\pm$ 1.01 ^{dgh}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<$

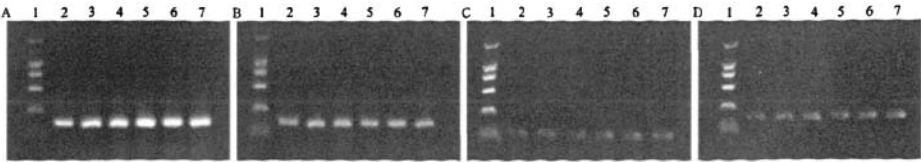
0.05,^d $P<0.01$;与西药对照组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;

与中药大剂量组比较,^g $P<0.05$;与中药中剂量组比较,

^h $P<0.05$

3 讨论

TGF- β 表达上调是肾间质纤维化特征之一,在肾小管间质纤维化发展的过程中起重要作用。有研究表明,TGF- β 是肾脏疾病中发生小球硬化及间质纤维化的中枢趋动因子,TGF- β 在使基质蛋白合成增加的同时又阻断了其降解^[5];在肾脏疤痕形成过程中,TGF- β 的持续活化造成了 ECM 的不断沉积与组织损伤,实验证明抑制 TGF- β 的生物活性,能够减轻 ECM 的沉积及纤维化的进程^[6-9]。肾小管间质纤维化是多种慢性肾脏病发展的共同结局,UUO 模型是目前常用的肾小管间质损伤模型之一。肾间质纤维化使肾脏结构改变,与肾功能减退有更密切的关系^[6]。朱辟疆等^[10]采用大黄和活血化痰中药的组方肾衰康治疗肾间质纤维化,结果表明,肾衰康可通过降低模型大鼠血中 TGF- β 1、纤维连接蛋白(FN)和层黏连蛋白(LN)以减轻肾脏损害,抑制肾



A: β -actin; B: TGF- β ; C: Smad2; D: Smad3; 1: Marker; 2~7 依次为:假手术组,模型组,中药大、中、小剂量组,西药对照组

图 2 PCR 检测各组大鼠 TGF- β 、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达

间质纤维化,从而延缓肾衰竭的进展。本实验中采用益气活血中药,结果显示,模型组 TGF- β 蛋白及 mRNA 表达均较假手术组明显升高,经益气活血中药治疗后,TGF- β 蛋白及 mRNA 表达均较模型组显著降低。表明益气活血中药能够通过抑制 TGF- β 的表达,从而延缓 UUO 模型大鼠肾间质纤维化的进展。

Smad 信号通路是 TGF- β 致肾间质纤维化的一条十分重要的信号通路,其基本过程为:TGF- β 信号转导先由 TGF- β 配体结合到细胞表面的 TGF- β 受体 I (T β R I) 上,再激活 T β R I 的丝氨酸/苏氨酸激酶区从而活化 T β R I,形成异源三聚体,T β R I 再磷酸化而激活 Smad2、Smad3 蛋白,激活的 Smad2、Smad3 蛋白与 Smad4 形成有活性的转录复合物进入核内,从而将信号从胞质转导到细胞核,并和其他的核协同或抑制因子结合,调节目的基因转录^[11]。Smad 蛋白是 TGF- β R 胞内激酶底物,参与 TGF- β 家族信号从受体的细胞内转导。Smad2、Smad3 是受体调节性 Smads(R-Smads),为 T β R 复合物的下游信号分子。TGF- β 在细胞膜上与其受体结合后,能引起 Smad2、Smad3 的磷酸化,磷酸化 Smad2 和 Smad3(p-Smad2、p-Smad3)与 Smad4 形成复合物,转移至核内,激活其致纤维化靶基因的表达,加速纤维化的进展^[12-13]。Smad2、Smad3 蛋白表达的多少意味着 Smad 信号转导通路激活的程度^[14]。本研究显示,模型组大鼠肾组织 TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的蛋白和 mRNA 表达明显增加,同时伴有严重的肾间质纤维化。用益气活血中药干预后,TGF- β 、Smad2 和 Smad3 的蛋白和 mRNA 表达则明显降低。进一步表明 TGF- β /Smad 信号通路是导致肾小管间质纤维化的关键通路,肾纤维化受 Smad2 和 Smad3 正向调节。益气活血中药可能是通过调节 TGF- β /Smad 信号通路起到治疗作用。

参考文献

- [1] Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology*(Carlton), 2005,10(1):48-56.
- [2] 赵爱育,张晓明,侯恒,等.姜黄素对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化影响的研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2007,14(6):348-351.
- [3] 孙元莹,李志军,史晓峰,等.益肾康对糖尿病大鼠转化生长因子 β 1 表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2004,11(3):169-172.
- [4] Zuccato C, Bianchi N, Borgatti M, et al. Everolimus is a potent inducer of erythroid differentiation and gamma-globin gene expression in human erythroid cells. *Acta Haematol*, 2007,117(3):168-176.
- [5] Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 2000,342(18):1350-1358.
- [6] 那宇,张晓喧,张晓东,等.还原型谷胱甘肽对单侧输尿管梗阻大鼠羟脯氨酸及氧化应激反应的影响. *中国危重病急救医学*, 2007,19(12):735-738.
- [7] Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, et al. Inhibitory smads and tgf- β signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol*, 2002,13(11):2657-2666.
- [8] Goto Y, Manabe N, Uchio-Yamada K, et al. Augmented cytoplasmic Smad4 induces acceleration of TGF- β 1 signaling in renal tubulointerstitial cells of hereditary nephritic ICGN mice with chronic renal fibrosis; possible role for myofibroblastic differentiation. *Cell Tissue Res*, 2004,315(2):209-221.
- [9] Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, et al. Treatment with anti-TGF- β antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- β signaling. *Kidney Int*, 2004,65(1):63-74.
- [10] 朱辟疆,韦先进,周逊,等.肾衰康抗肾间质纤维化的实验研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2003,10(6):346-349.
- [11] Bai S, Cao X. A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, 2002,277(6):4176-4182.
- [12] Kretschmar M, Massagué J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 1998,8(1):103-111.
- [13] 张浩,刘伏友,刘映红,等.转化生长因子 β 1 对人腹膜间皮细胞结缔组织生长因子的影响. *中华肾脏病杂志*, 2004,20(4):282-285.
- [14] Li JH, Zhu HJ, Huang XR, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol*, 2002,13(6):1464-1472.

(收稿日期:2010-05-22)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》对作者署名的一般要求

同时具备以下 3 项条件者方可署名为作者:①参与选题和设计,或参与资料的分析与解释者;②起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者;③能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。

仅参与研究项目资金的获得或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。对文章中的各主要结论,均必须至少有 1 位作者负责。作者中如有外籍作者,应征得本人同意,并在投稿时向编辑部提供相应证明材料。集体署名的文稿,在题名下列出署名单位,并于文末列出整理者姓名,并须明确该文的主要负责人,在论文首页脚注通信作者姓名、单位、邮政编码及 Email 地址。通信作者一般只列 1 位,由投稿者确定。如需注明协作组成员,则于文末参考文献前列出协作组成员的单位及姓名。作者的具体排序应在投稿前即确定,在编排过程中不应再改动,确需改动时必须出示单位证明。