

段艳华,陈云祥,郑高利,等. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 10-19.

Duan YH, Chen YX, Zheng GL, et al. Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF- β 1/Smad signaling [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 10-19.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.002

基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用

段艳华^{1,2,3}, 陈云祥^{2,3}, 郑高利^{2,3}, 温磊^{2,3}, 陈浩^{2,3}, 张丽丽^{2,3}, 秦荔^{2,3},
王佳虹^{2,3}, 刘芳^{2,3}, 夏道宗^{1*}, 张立将^{2,3*}

(1. 浙江中医药大学 药学院, 杭州 310053; 2. 杭州医学院 安全性评价研究中心, 杭州 310053;
3. 浙江省药物安全性评价技术研究重点实验室, 杭州医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 研究虎杖醇提物 (ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum*, PCE) 对小鼠肾间质纤维化的保护作用及其潜在分子机制。**方法** 将 50 只雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为 5 组 ($n = 10$): 正常对照组、模型组、虎杖醇提物低、中、高 (75、150、300 mg/kg) 剂量组。除正常对照组外, 其他各组灌胃腺嘌呤构建肾间质纤维化模型, 虎杖醇提物低、中、高剂量组同时灌胃给予不同剂量的虎杖醇提物混悬液。各组灌胃给药 42 d 后用生化试剂盒测定血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 和尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平, 通过苏木精伊红染色和 Masson 三色染色分别观察小鼠肾组织病理学变化及胶原沉积情况, 采用 Western Blot 法检测小鼠肾组织中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、Smad6、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 (Collagen I) 的表达情况。**结果** 与正常对照组比较, 模型组小鼠 BUN、Scr 水平显著增高 ($P < 0.01$)。肾组织病理学 HE 染色可见肾小管结构破坏, 炎细胞浸润肾间质, 完整的健存肾单位明显减少; Masson 染色可见胶原纤维蓝色阳性染色面积明显增多。肾组织 TGF- β 1 的表达明显增多 ($P < 0.01$), 而 TGF- β /Smad 通路的负调节因子 Smad6 的表达显著下调 ($P < 0.01$)。上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 标志蛋白之一 α -SMA、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白之一 Collagen I 的表达明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 虎杖醇提物各给药组 BUN、Scr 水平以及肾组织 TGF- β 1、 α -SMA 及 Collagen I 的蛋白表达水平呈剂量依赖性降低, Smad6 的表达水平呈剂量依赖性升高。肾组织的病理改变及纤维沉积面积均有不同程度的改善。**结论** 虎杖醇提物能减轻腺嘌呤诱导的小鼠肾功能损伤, 改善肾间质纤维化, 其机制与干预 TGF- β 1/Smad 信号通路, 抑制 EMT 及 ECM 蛋白沉积有关。

【关键词】 肾间质纤维化; 虎杖醇提物; TGF β 1/Smad 信号通路; 上皮-间充质转化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0010-10

Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF- β 1/Smad signaling

DUAN Yanhua^{1,2,3}, CHEN Yunxiang^{2,3}, ZHENG Gaoli^{2,3}, WEN Lei^{2,3}, CHEN Hao^{2,3}, ZHANG Lili^{2,3}, QIN Li^{2,3},
WANG Jiahong^{2,3}, LIU Fang^{2,3}, XIA Daozong^{1*}, ZHANG Lijiang^{2,3*}

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81673656), 浙江省重点研发计划项目 (2020C03053, 2021C03077)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (81673656), Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2020C03053, 2021C03077).

【作者简介】 段艳华, 女, 实验师, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物安全性评价与药理毒理学研究。Email: 307910220@qq.com

【通信作者】 夏道宗, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药代谢、抗炎与免疫药理研究。Email: xiadaozong@zemu.edu.cn;
张立将, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 药物安全性评价与药理毒理学研究。Email: zhanglj127@163.com。

* 共同通信作者

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. Center for Drug Safety Evaluation, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053. 3. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053)

Corresponding author: XIA Daozong. E-mail:xiadaozong@zcmu.edu.cn; ZHANG Lijiang. E-mail:zhanglj127@163.com

[Abstract] Objective This study aimed to test the efficacy of an ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* (PCE) against adenine-induced renal interstitial fibrosis (RIF) in C57BL/6N mice and reveal its underlying molecular mechanisms of action. **Methods** An RIF model was induced by gavaging C57BL/6N mice with adenine. Fifty male C57BL/6N mice were randomly divided into five groups ($n=10$ per group): normal control group, model group, PCE-L, PCE-M and PCE-H (75, 150, 300 mg/kg, respectively) groups. After treatment for 42 consecutive days, serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were measured with commercially purchased kits. Histopathological changes to the kidneys were assessed by HE and Masson staining. The protein expression levels of TGF- β 1, Smad6, α -SMA, and type I collagen (Collagen I) in kidney tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significantly increased BUN and Scr ($P < 0.01$). The protein expression level of TGF- β 1 was significantly increased ($P < 0.01$), while Smad6, a negative regulator of the TGF- β /Smad pathway, was significantly downregulated ($P < 0.01$). The expression of the epithelial-mesenchymal transformation (EMT) marker protein α -SMA and the extracellular matrix (ECM) protein Collagen I were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the drug intervention groups showed decreased levels of BUN and Scr; declining protein expression levels of TGF- β 1, α -SMA and Collagen I; increased levels of Smad6 protein; and the alleviation of pathological changes. **Conclusions** PCE treatment attenuated adenine-induced renal impairment and ameliorated renal interstitial fibrosis in mice. The mechanism of action may be related to changes to the TGF- β 1/Smad signaling pathway and the suppression of EMT and ECM protein deposition.

[Keywords] renal interstitial fibrosis; ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum*; TGF β 1/Smad signaling pathway; epithelial-mesenchymal transformation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性肾疾病(chronic kidney disease, CKD)具有发病率高、知晓率低、预后差、医疗费用高等特点,是心脑血管疾病、糖尿病、和恶性肿瘤之外又一严重危害人类健康的疾病,近年来,CKD 患病率逐年上升,全球一般人群患病率已达 14.3%^[1]。CKD 是由多种肾疾病,如肾盂肾炎、肾小球肾炎、肾结石,非肾疾病如痛风、糖尿病、高血压以及药物毒副作用引起的缓慢性进行性肾功能不全的临床综合征^[2],CKD 的发生又会增加痛风、糖尿病、高血压的发病率及死亡率,从而引发公共卫生问题。

CKD 的治疗方法有限,通常通过控制潜在的病因来减缓其进展,当 CKD 进展为终末期肾衰竭时(end stage renal disease, ESRD),通常使用肾替代治疗方法:透析和肾移植^[1]。然而,透析对 ESRD 的肾功能损伤及肾组织的病理改变修复作用有限;肾移植存在着供体短缺,不易获得、易发生移植排斥反应、价格昂贵等缺点^[3]。因此,人们需要寻找更有效的治疗方法来治疗 CKD,并减少医疗支出。

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)几

乎是所有肾疾病进展到 ESRD 的共同病理途径^[4],因此,深入探讨 RIF 疾病机制,积极寻找可以早期阻止甚至逆转 RIF 的药物具有重要的意义。许多信号转导分子和途径参与肾间质纤维化的发展,转化生长因子- β (TGF- β) 超家族信号转导通路是肾组织纤维化的中心介质,TGF- β 可通过 Smad 和非 Smad 依赖途径促进肾纤维化的进展。因此干预 TGF- β 通路及其下游靶点就成为治疗肾纤维化的理想选择。天然植物具有较好的抗纤维化效果,且价格低廉,容易获取,因此成为近年来研究的热点。

中医古籍中无 CKD 对应的病名,也无对应的文献记载,根据其临床表现及发病特点,当属“水肿”、“肾水”、“肾劳”、“肾积”、“腰痛”、“虚劳”、“关格”、“尿浊”等。CKD 起源于脾肾之气亏虚,日久由虚致实,可见湿热、湿邪、瘀血等各种病理之气交杂。故在治疗上主张补益脾肾,益气养血以固其本,兼以清热利湿,活血化瘀以治其标^[5]。中药虎杖为蓼科多年生草本植物虎杖的干燥根茎和根,味微苦,性微寒,归肝、胆、肺经。具有利湿退黄、清热

解毒、散瘀止痛和止咳化痰等功效。用于湿热黄疸、淋浊、带下、风湿痹痛、痈肿疮毒、水火烫伤、经闭、癥瘕、跌打损伤、肺热咳嗽^[6]。临床上取其清热利湿、散瘀止痛的功效,用于治疗慢性肾病证属湿热瘀血者^[7]。尽管中医使用虎杖治疗慢性肾病的临床疗效确定,但其用于治疗 CKD 的作用机制尚不清楚。

现代药理学研究表明:虎杖中主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、香豆素类以及一些脂肪酸类化合物,其主要活性成分白藜芦醇和虎杖苷具有抗氧化、抗炎、免疫调节作用^[8]。虎杖有效成分大黄素、白藜芦醇可以不同程度改善糖尿病肾病小鼠肾组织病理损伤,改善肾小管、肾小球病变,延缓肾小球细胞外基质增生,抑制肾小球硬化以及肾组织纤维化^[9]。虎杖苷可以通过调节 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子(NF- κ B)信号通路,下调炎症因子表达水平,改善糖尿病肾病大鼠肾的炎性损伤^[10]。

我们的研究使用腺嘌呤诱导 C57BL/6N 小鼠肾间质纤维化,并用虎杖醇提取物(ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum*, PCE)对其进行药物干预,观察 PCE 对肾间质纤维化模型小鼠肾功能指标及组织病理学变化的影响,以及其对 TGF- β 1/Smad 信号通路相关信号分子、EMT 和 ECM 蛋白沉积的干预作用,从而评估虎杖醇提取物对腺嘌呤诱导的肾间质纤维化的保护作用,探讨其逆转肾间质纤维化的分子机制及可能的治疗靶点。为虎杖的临床用药和新药开发提供实验依据,为治疗 CKD 的新药开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠 50 只,体重 24 ~ 30 g,12 周龄,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2019-0001】,饲养于杭州医学院安全性评价研究中心 SPF 级屏障系统【SYXK(浙)2017-0010】,屏障系统具有 12 h/12 h 光/暗循环周期,温度为 20 ~ 25℃,湿度为 40% ~ 5%。饲养期间,自由饮水,饲喂普通维持饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供。饲养管理符合国际 AAALAC 认证的要求。实验设计经杭州医学院安全性评价

研究中心实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准(KY-2021-020)。所有实验均按照相关指南和规定进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤:每瓶 25 g,纯度>99%,购自 Sigma 公司,批号:WXBD2576V;磷酸酸水合物、酸性品红、亮绿 SF、苯胺蓝、伊红 Y 购自上海阿拉丁;肌酐测定试剂盒(苦味酸法,批号:171044/50005547)、尿素氮测定试剂盒(谷氨酸脱氢酶法,批号:27324/60134661)购自德赛诊断系统有限公司;兔单克隆抗体:Anti-TGF- β 1(货号:ab215715)、Anti-Smad6(货号:ab273106)、Anti- α -SMA(货号:ab124964)、Anti-Collagen I(货号:ab270993)、Anti-GAPDH(货号:ab181603)购自 Abcam 公司(Cambridge, UK);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(货号:A0208)、RIPA 裂解液(货号:P0013B)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)(货号:P0015L)、PMSF(货号:ST506)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(货号:P1045)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(货号:P0012A)、脱脂奶粉(货号:P0216)、BeyoECL Star(货号:P0018AS)购于上海碧云天生物技术有限公司;PageRuler 预染蛋白 Marker(货号:26616)购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

HITACHI 7100 全自动生化仪(日立公司,日本),Bio Tek® Synergy HT 全自动荧光酶标仪(BioTek 公司,美国),DM3000 显微镜等病理全套设备(Leica 公司,德国);IKA 组织匀浆机(IKA 公司,德国);Bio-Rad 蛋白电泳系统(Bio-Rad 公司,美国);Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国);ChemiScope 6000 化学发光成像仪(上海勤翔科技有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 虎杖醇提取物的制备及给药剂量的确定

虎杖购自浙江中医药大学中药饮片厂,取 150 g 虎杖饮片粉碎后过 3 号筛,以 65% 乙醇,料液比 1:40,功率 350 W,频率 55 kHz 超声提取 20 min,提取液旋蒸后冷冻干燥,冻干粉冷藏,得到虎杖醇提取物 32.3 g,得率为 21.5%。根据中国药典 2020 年版一部^[6],虎杖的人用量为 9 ~ 15 g,中药饮片对小鼠的等效剂量为 1.16 ~ 1.93 g/kg,相当于虎杖醇提取物 249 ~ 414 mg/kg。结合预实验,最终确定虎杖醇

提物低剂量组、中剂量组、高剂量组的给药剂量分别为 75、150、300 mg/kg。

1.2.2 动物分组、造模及给药

50 只 C57BL/6N 小鼠进入屏障系统后适应性喂养 1 周,随机分为 5 组:正常对照组、模型组、虎杖醇提物低剂量组(PCE-L, 75 mg/kg)、中剂量组(PCE-M, 150 mg/kg)、高剂量组(PCE-H, 300 mg/kg),每组 10 只。各组小鼠每天称重 1 次,按体重 10 mL/kg 灌胃,每天上午虎杖醇提物低、中、高剂量组分别给予相应浓度的虎杖醇提物混悬液,正常对照组和模型组按体重给予纯水。下午对照组按体重给予纯水,其他各组均灌胃给予 60 mg/kg 的腺嘌呤混悬液,连续给药 42 d。

1.2.3 标本采集及取材

第 42 天给药后,禁食不禁水 12 h,所有动物在第 43 天麻醉,从腹主动脉获取血液,并在 4℃ 下以 3000 r/min 离心 10 min。分离血清,以进行生化分析。采血后,取下肾,冲洗并快速称重,观察 PCE 对肾表观的影响。肾组织分为两组,左肾福尔马林固定用于组织病理学评估、右肾液氮快速冷冻后,在 -80℃ 下保存,用于 Western Blot 分析。

1.2.4 常规肾损伤生化指标检测

按照试剂说明书的方法,使用全自动生化分析仪检测各组小鼠的血清尿素氮、肌酐水平。

1.2.5 肾组织病理形态学观察

取肾,用生理盐水冲洗后福尔马林固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,用切片机将包埋好的组织进行连续切片,切片厚度为 4~5 μm 。切片用苏木素和伊红染色(HE)以观察肾组织病理学改变,Masson 三色染色以观察肾间质纤维化胶原沉积程度,蓝色线状或颗粒状沉积物计为胶原蛋白阳性。每个实验组随机选择 3 个肾的 Masson 染色病理切片,在 200 倍放大率下每个肾随机选择不重叠的 10 个视野,避开肾内大血管,将呈现蓝色的纤维化区域作为阳性目标,使用 Image J 软件计算阳性面积与整个视野总面积的比值,对 Masson 三色染色胶原沉积面积进行量化并使用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。

1.2.6 Western Blot 法检测 TGF- β 1/Smad 通路相关信号分子及 EMT、ECM 相关蛋白表达水平

分别取各实验组小鼠肾组织置于预冷的 RIPA 裂解缓冲液中,用电动匀浆机匀浆,匀浆后在 4℃ 下

持续震荡 1 h,随后 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min,从离心机中取出离心管置于冰上,吸取上清液采用 BCA 蛋白定量法测蛋白浓度,加上样缓冲液及 RIPA 缓冲液制备样品,使得 5 组蛋白样品浓度达到一致。每组上样量为 21 μg ,经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,用 Bio-Rad 转膜装置将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,然后在 4℃ 下与一抗孵育过夜[抗体稀释浓度: TGF- β 1 (1 : 1000)、Smad6 (1 : 1000)、 α -SMA (1 : 10000)、Collagen I (1 : 1000)、GAPDH (1 : 10000)]。次日在室温下与辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 1 h。用特超敏 ECL 化学发光试剂盒显影,化学发光显影仪进行曝光、扫描。以 GAPDH 为内参,通过 Image J 软件根据目的条带与内参的灰度值比值进行半定量分析。上述实验均使用来自不同小鼠的肾组织至少重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,计量资料数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。选用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性分析,总体组间差异有统计学意义 $P < 0.05$ 时,进行组间两两比较。当方差齐性时,组间两两比较采用 LSD 法分析,当方差不齐时采用 Dunnett's T_3 法分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠一般精神状况和体重变化的影响

实验期间,正常对照组小鼠反应灵敏,毛发光泽顺滑,生长、进食及二便正常,模型组在灌服腺嘌呤后出现活动量减少,喜静蜷卧,反应迟钝,进食减少,日益消瘦,皮毛枯槁无光泽,小便增多等症状。PCE 给药各剂量组能不同程度地改善腺嘌呤给药后的一般状况,且呈剂量依赖性。

随机分组时,各组小鼠的体重差异无统计学意义($P > 0.05$),正常对照组在给药期间,体重一直呈自然增长,其他各组小鼠体重均有不同程度下降,实验第四周时,模型组小鼠体重明显低于同期对照组($P < 0.01$),PCE 低、中、高剂量组对腺嘌呤造模导致的体重下降具有改善作用,且呈剂量依赖性,其中 PCE 高剂量组与同期模型组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾纤维化小鼠体重变化的影响 (n = 10)

Table 1 Effects of PCE on body weight of mice with adenine-induced renal fibrosis (n = 10)

组别 Groups	体重(g) Weight(g)					
	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6
正常对照组 Normal control group	25.84 ± 2.00	27.01 ± 1.97	27.08 ± 1.78	27.10 ± 2.30	27.27 ± 2.17	27.20 ± 2.06
模型组 Model group	25.96 ± 1.47	26.76 ± 1.52	26.46 ± 1.64	24.79 ± 1.85 ^{##}	22.81 ± 2.78 ^{##}	22.72 ± 1.73 ^{##}
PCE-L 组 PCE-L group	25.10 ± 1.67	26.63 ± 1.89	24.89 ± 2.50 [#]	24.04 ± 2.89 ^{##}	23.75 ± 2.75 ^{##}	23.18 ± 2.90 ^{##}
PCE-M 组 PCE-M group	25.43 ± 1.56	27.05 ± 1.50	25.58 ± 1.54 [#]	24.62 ± 2.26 ^{##}	23.83 ± 2.28 ^{##}	23.52 ± 1.87 ^{##}
PCE-H 组 PCE-H group	25.26 ± 1.21	26.50 ± 1.85	25.97 ± 1.68	25.52 ± 1.11	25.81 ± 1.59 ^{**}	25.12 ± 1.88 ^{**}

注:与正常对照组比较,^{##}*P* < 0.01;与模型组比较,^{**}*P* < 0.01。(下表/图同)
Note. Compared with the normal control group,^{##}*P* < 0.01. Compared with the model group,^{**}*P* < 0.01. (The same in the following tables and figures)

2.2 虎杖醇提物对腺嘌呤诱导的肾间质纤维化小鼠血清肌酐、尿素氮水平的影响

由表 2 可见,与对照组相比,模型组血清肌酐、尿素氮(Scr、BUN)水平显著升高(*P* < 0.01)。虎杖醇提物各给药组小鼠血清肌酐、尿素氮与对照组相比,仍有不同程度的增高,但与模型组相比,血清肌酐、尿素氮水平呈剂量依赖性降低,其中虎杖醇提物高剂量组对腺嘌呤所导致的肌酐、尿素氮升高具有明显改善作用,与模型组相比差异具有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.3 肾形态学改变

2.3.1 肉眼观察

正常对照组小鼠肾大小适中,颜色褐红,表面光洁、质地坚韧;而模型组小鼠肾略肿大,呈淡棕褐色,表面凹凸不平,可见颗粒状隆起。虎杖醇提物各给药组对肾外观具有不同程度的改善作用,呈剂量依赖性,以虎杖醇提物高剂量组对肾大体外观改善最明显(见图 1)。

表 2 PCE 对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠血清尿素氮、肌酐的影响 (n = 10)

Table 2 Effects of PCE on blood urea nitrogen and serum creatinine in mice treated with adenine (n = 10)

组别 Groups	血肌酐(μmol/L) Scr (μmol/L)	血尿素氮 (mmol/L) Bun (mmol/L)
正常对照组 Normal control group	38.95 ± 8.50	14.00 ± 5.50
模型组 Model group	89.19 ± 15.30 ^{##}	45.46 ± 8.04 ^{##}
PCE-L 组 PCE-L group	84.74 ± 8.09 ^{##}	44.82 ± 3.35 ^{##}
PCE-M 组 PCE-M group	71.24 ± 14.17 ^{##}	37.43 ± 10.19 ^{##}
PCE-H 组 PCE-H group	56.65 ± 13.46 ^{###}	26.31 ± 11.05 ^{**}

注:与正常对照组比较,[#]*P* < 0.05。(下表/图同)
Note. Compared with the normal control group,[#]*P* < 0.05. (The same in the following tables and figures)

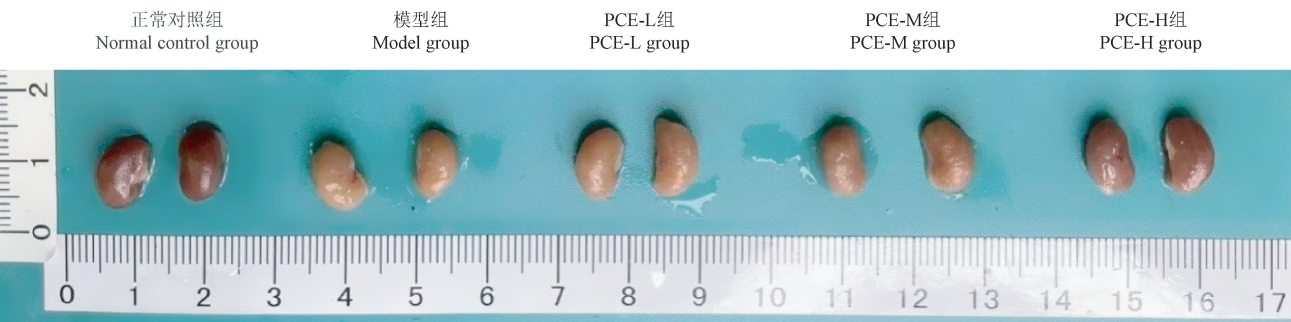


图 1 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾纤维化小鼠肾大体外观的影响

Figure 1 Effects of PCE on the general appearance of kidney in mice treated with adenine

2.3.2 肾组织病理形态学观察

(1)肾组织 HE 染色结果

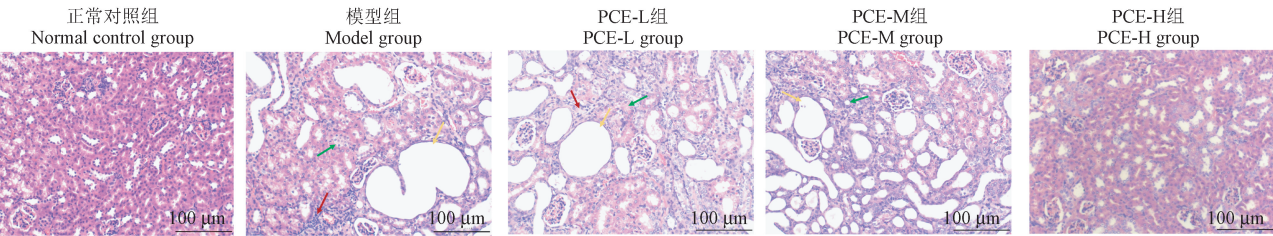
如图 2 所示,正常对照组小鼠肾组织结构正常,皮髓质分界清楚,肾小管上皮细胞大小一致、形态饱满、排列整齐,呈单层立方结构,肾小管以背对背(back to back)的方式排列,间质空间几乎不存在。模型组小鼠肾小管结构破坏,出现坏死,高度扩张的肾小管和萎缩的肾小管并存,部分肾小管上皮细胞扁平、缺失、坏死,脱落的肾小管上皮细胞在管腔内形成细胞碎片或细胞管型,肾小管分离,出现间质间隔。炎细胞浸润肾间质,完整的健存肾单位明显减少。与模型组相比,PCE 各剂量给药组的组织病理学改变有不同程度的改善,呈剂量依赖性。高剂量组肾小管上皮细胞大小一致,排列整齐,细胞形态饱满,高度扩张的肾小管和萎缩的肾小管较模型组明显减少。肾小球形态规则,未见炎细胞浸润,完整的健存肾单位较模型组有显著增多,对腺嘌呤所致肾组织的病理改变有很好的改善。

(2)肾组织 Masson 染色结果

Masson 染色是肾纤维化的主要染色方法之一。

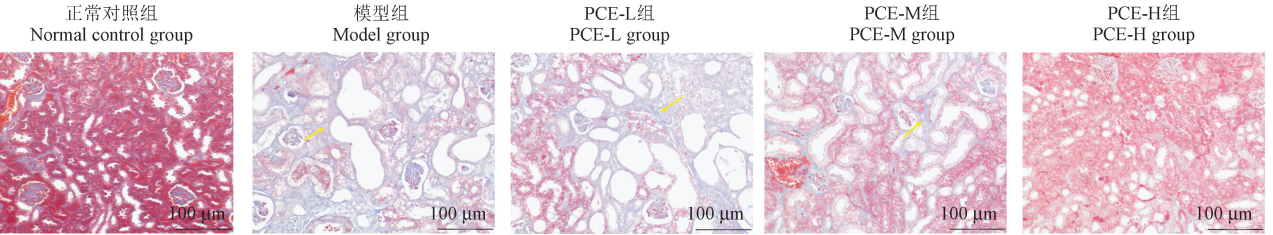
主要用于区分胶原纤维和肌原纤维,在肾穿刺活检标本中,用于显示肾小球沉淀的免疫复合物和基底膜、系膜基质及胶原纤维等^[11]。Masson 染色后,肾小球基底膜沉积物(免疫复合物)呈红色。基底膜、系膜、胶原纤维呈蓝色,肾小管管腔、胞质、红细胞呈鲜红色,细胞核呈棕褐色^[12]。肾间质纤维化发生时,肾间质中大量胶原纤维沉积,因此,蓝色阳性染色面积明显增多,通过比较每组蓝色区域的面积来确定肾病变产生纤维化的程度。

如图 3、图 4 所示,正常对照组肾小球和肾小管形态规则,肾小管上皮细胞排列规则整齐,无系膜增生,间质正常,除了肾内动脉周围、基底膜、系膜有预期的蓝色染色外,几乎没有蓝色染色;模型组小鼠肾间质显示出大量胶原纤维条纹,染色呈蓝色,提示明显的肾间质纤维化,与模型组相比,虎杖醇提物低、中、高剂量组蓝色阳性染色面积均有不同程度的减少,肾组织胶原沉积及肾间质纤维化较模型组改善。经统计学分析显示,虎杖醇提物低、中、高剂量组对腺嘌呤所致小鼠肾组织胶原沉积面积增加均有明显的改善作用($P < 0.01$)。



注:黄色箭头:高度扩张的肾小管;绿色箭头:萎缩的肾小管;红色箭头:炎细胞浸润。
图 2 肾切片的 HE 染色代表性显微图像反映虎杖醇提物对小鼠肾组织病理学变化的影响
Note. Yellow arrows. Highly dilated tubules. Green arrows. Atrophied tubules. Red arrows. Inflammatory cells infiltration.

Figure 2 Representative photomicrographs of HE staining of kidney sections reflect effects of PCE on histopathological changes in the kidneys of mice treated with adenine



注:黄色箭头:肾间质纤维化和胶原沉积。
图 3 肾组织切片的代表性 Masson 染色显微图像反映虎杖醇提物对肾间质纤维化小鼠胶原沉积的影响
Note. Yellow arrows. Areas of fibrosis and collagen deposition.

Figure 3 Representative photomicrographs of Masson's trichome staining of kidney sections reflect effects of PCE on the collagen deposition in mice treated with adenine

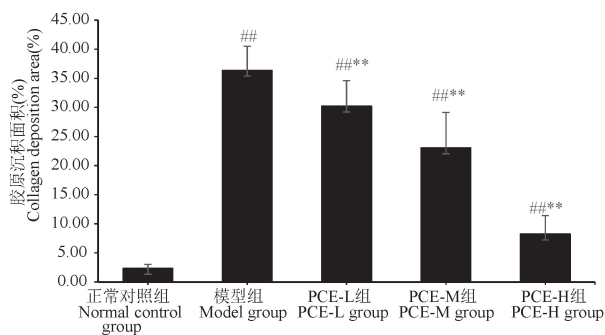


图 4 PCE 对肾间质纤维化小鼠胶原沉积面积的影响 ($n=3$)

Figure 4 Effects of PCE on the collagen deposition area in mice treated with adenine ($n=3$)

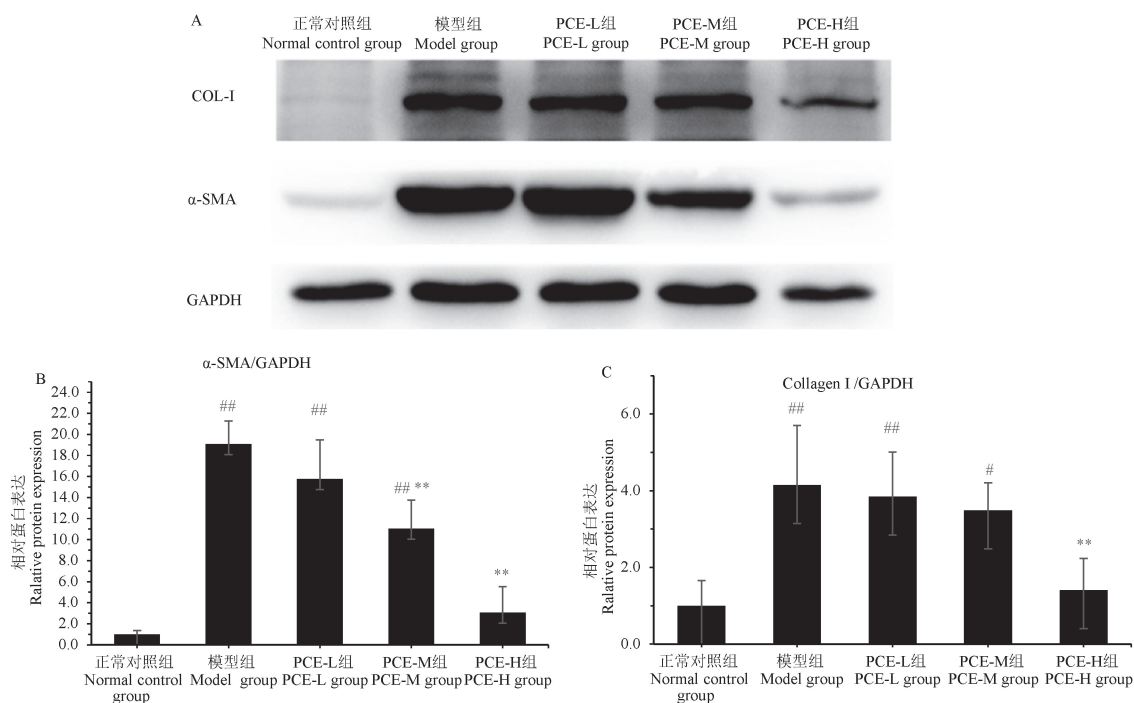
2.4 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠的 EMT、ECM 蛋白沉积的影响

肾小管上皮细胞向间充质或成纤维细胞表型的转化或转分化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 是肾纤维化过程中的关键因素,其特征是肾小管细胞失去上皮表型,如 E-钙粘蛋白 (E-cadherin),并获得间充质性质的新特征如波形蛋白 (vimentin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 等^[13]。所有纤维化疾病的共同特征是激活产生细

胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白的肌成纤维细胞^[14],在信号通路的参与下,经过 EMT 后的肾小管上皮细胞丢失了上皮表型、获得间质细胞表型,进而活化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞能分泌细胞 ECM 蛋白,主要包括 I 型和 IV 型胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白等^[15]。当 ECM 合成增多或分解减少时,器官便会发生纤维化,甚至发生硬化^[15]。

为检测虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾纤维化小鼠的 EMT、ECM 蛋白沉积的影响,本研究使用 Western Blot 对 EMT 标志性蛋白 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA),ECM 的重要组成部分 Collagen I 进行了检测。

如图 5 所示,经 Western Blot 检测,与对照组相比,模型组小鼠给予腺嘌呤造模后肾组织中 α -SMA、Collagen I 的蛋白表达水平显著增加, (均为 $P < 0.01$)。表明腺嘌呤成功激活了肾小管上皮细胞上皮-间充质转化 (EMT),导致细胞外基质 (ECM) 蛋白过度沉积。与模型组比,虎杖醇提物给药组呈剂量依赖性的抑制腺嘌呤诱导的 α -SMA 及 Collagen



注: A: Western Blot 检测所得小鼠肾中 α -SMA、Collagen I 蛋白的代表性条带; B, C: α -SMA、Collagen I 蛋白印迹的半定量分析。

图 5 Western Blot 代表性条带反映虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠肾组织中的 α -SMA、Collagen I 蛋白水平的影响 ($n=3$)

Note. A. Representative Western Blot showed the expression of α -SMA, Collagen I in mouse kidneys. B, C. α -SMA, Collagen I levels in Western Blot were quantified via densitometry and were normalized to GAPDH.

Figure 5 Representative bands of Western Blot reflect the effect of PCE on the protein expression of α -SMA and Collagen I in kidney tissues of mice ($n=3$)

I 蛋白高表达, PCE-M 和 PCE-H 组能显著抑制 α -SMA 蛋白表达水平的升高 ($P < 0.01$); PCE-H 组能显著抑制 Collagen I 蛋白表达水平的升高 ($P < 0.01$)。因此虎杖醇提物可以抑制腺嘌呤所致的肾间质纤维化小鼠肾小管上皮细胞 EMT, 减少 ECM 蛋白沉积, 从而减轻肾间质纤维化进程, 发挥肾保护作用。

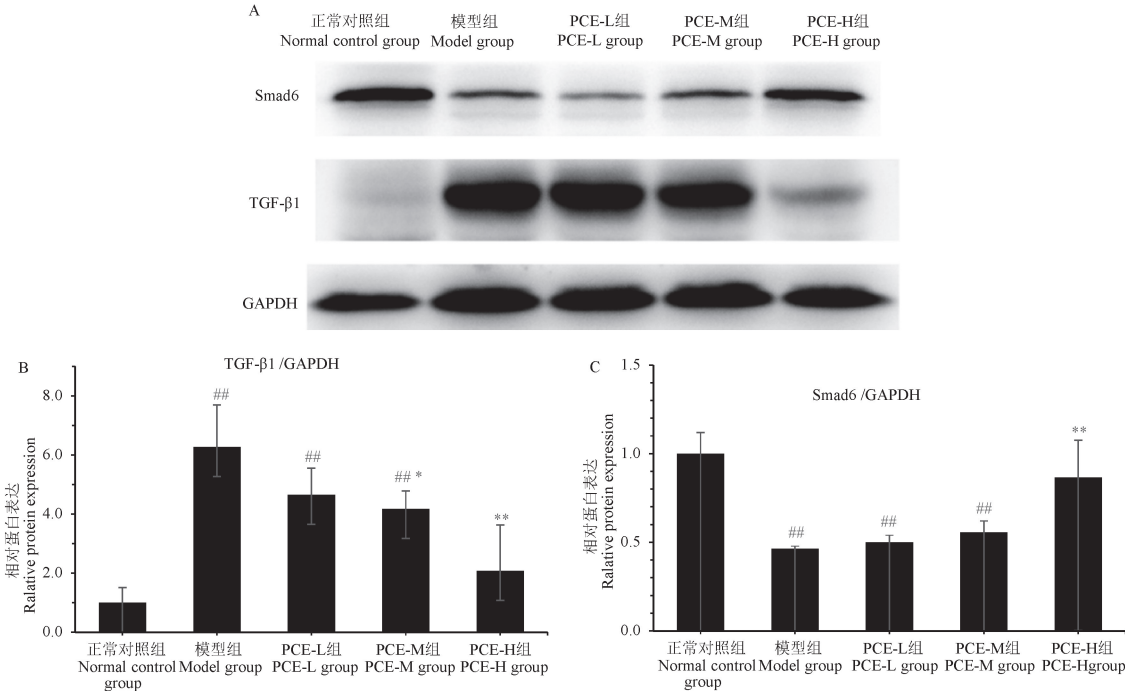
2.5 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠的 TGF- β 1/Smad 信号通路相关信号分子的影响

转化生长因子- β (TGF- β) 超家族信号转导通路是肾组织纤维化的中心介质。哺乳动物体内存在 3 种 TGF- β 亚型: TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3, 其中 TGF- β 1 在肾中表达最多。TGF- β 通过转化生长因子- β 受体 II (T β RII)、转化生长因子- β 受体 I (T β RI) 及其细胞内介质 Smads 诱发 EMT, 并增加 ECM 蛋白如: I 型和 IV 型胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白的合成和分泌, 发挥其促纤维化作用^[16]。

Smads 蛋白是将 TGF- β 信号从细胞质转移到细胞核的中转分子。Smads 家族依据其不同的作用被

划分为 3 类: 受体调控的 Smads (R-Smad; Smad 1、2、3、5、8), 共调节 Smads (Co-Smads; Smad4、Smad10), 抑制性 Smads (I-Smad; Smad6、Smad7)。磷酸化的 Smad2、Smad3 与 Co-Smad (Smad4) 形成复合物, 并转移到细胞核, 调节下游促纤维化因子的表达^[17]。I-Smads (Smad6 和 Smad7) 与活化的 T β RI 结合并竞争性阻止 T β RI 激活 R-Smads。此外, Smad6 还可与激活的 R-Smads 相互作用并干扰其与 Smad4 形成复合物, 抑制 R-Smad 的磷酸化, 从而减弱 EMT 诱导^[18]。为检测 TGF- β 1/Smad 信号通路是否参与了 PCE 的抗肾纤维化作用, 本研究采用 Western Blot 检测了各组小鼠肾组织中的 TGF- β 1、Smad6 蛋白表达水平。

如图 6 所示, Western Blot 代表性条带所示: 腺嘌呤造模 42 d 后, 模型组小鼠肾组织中的 TGF- β 1 水平显著高于对照组 ($P < 0.01$), PCE 给药组能呈剂量依赖性的抑制腺嘌呤给药导致的 TGF- β 1 水平升高; 与模型组相比, PCE-M 组和 PCE-H 组能显著抑制 TGF- β 1 蛋白表达 (分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组相比, 模型组小鼠肾组织中 TGF-



注: A: Western Blot 检测所得小鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad6 蛋白的代表性条带; B, C: TGF- β 1、Smad6 蛋白印迹的半定量分析。与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 Western Blot 代表性条带反映虎杖醇提物对小鼠肾组织中的 TGF- β 1、Smad6 蛋白水平的影响 ($n = 3$)
Note. A. Representative Western Blot showed the expression of TGF- β 1, Smad6 in mouse kidney tissues. B, C. α -SMA, Collagen I levels in Western Blot were quantified via densitometry and were normalized to GAPDH. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Representative bands of Western Blot reflect the effect of PCE on the protein expression of TGF- β 1 and Smad6 in kidney tissues of mice ($n = 3$)

β 信号通路的负调节因子 Smad6 的水平显著降低 ($P < 0.01$), PCE 给药组能呈剂量依赖性的改善腺嘌呤给药导致的 Smad6 水平降低, 其中 PCE-H 组能显著逆转 Smad6 蛋白表达水平的降低 ($P < 0.01$)。因此, PCE 可通过 TGF- β 1/Smad 信号通路发挥抗肾间质纤维化的作用。

3 讨论

肾间质纤维化是由肌成纤维细胞在慢性炎症反应中过度沉积细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白引起的疤痕和组织硬化^[14]。本研究采用腺嘌呤持续灌胃建立小鼠 CKD 肾间质纤维化模型, 目前常用的慢性肾损伤造模方法有生物法、化学法和物理法^[19]。早在 1986 年, 日本学者 Yokozawz 等^[20]就提出了用腺嘌呤饲养或灌胃的方式构建慢性肾损伤模型。当机体摄入大量腺嘌呤时, 异常高浓度的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下转化为极难溶于水的 2,8 二羟基腺嘌呤 (2,8-DHA), 沉积于肾小管, 使肾小管梗阻, 肾单位大量丧失, 导致氮质血症、电解质和氨基酸代谢紊乱, 从而引起肾间质纤维化和肾功能损伤^[21]。本研究选用腺嘌呤诱导小鼠肾功能损伤, 和人类的慢性肾功能损伤病理过程相似, 且具有造模成功率高、操作方便的优点。经过多次预实验和众多文献的参考, 最终选择 60 mg/kg 的腺嘌呤连续灌胃给药 42 d, 经生化检测血清肌酐、尿素氮的含量及电镜观察组织病理学形态, 显示造模成功。

小鼠经腺嘌呤给药后出现活动量减少, 喜静蜷卧, 反应迟钝, 进食量减少, 日益消瘦等脾气亏虚的症状, 以及皮毛枯槁无光泽, 小便增多等肾气虚损的症状。脾主运化水湿, 脾虚则运化失调, 水湿痰饮之邪内困; 气为血之帅, 气能行血, 脾肾气虚则气不能行血, 血行不畅则瘀血内生。久之则痰湿、血瘀、浊毒内阻, 损伤肾络, 导致肾功能下降, 肾间质纤维化等病变。其中痰浊为肾纤维化的病理代谢产物, 瘀血为邪实之首, 既是病理产物, 又是加重病变发展的致病因素^[22]。本研究以中药虎杖清热利湿、活血散瘀为主要治疗原则, 祛除痰浊、瘀血等病理产物, 从而改善肾功能, 延缓肾纤维化的进展。

本研究显示: 虎杖醇提物高剂量组 (300 mg/kg) 对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠的一般状况、体重、血清肾功能指标 (BUN、Scr) 以及肾组织病理学及胶原沉积面积的改变具有明显改善作用。且

可逆转模型组小鼠肾组织的 TGF- β 1 蛋白高表达, TGF- β 信号通路的负调节因子 Smad6 的低表达, 以及 EMT、ECM 相关蛋白: α -SMA、Collagen I 蛋白的高表达。研究结果表明虎杖醇提物可通过抑制 TGF- β 1 的表达, 阻断 TGF- β 下游信号效应因子的表达, 并增加负调节因子 Smad6 的表达, 抑制 R-Smad 的磷酸化, 减弱 EMT 诱导及 ECM 蛋白沉积, 从而发挥抑制肾纤维化保护肾的作用。本研究结果为中药虎杖的临床应用提供了一定的实验和理论依据, 但本实验仅选取了 TGF- β 1/Smad 信号通路的部分信号分子进行了研究, 未对 Smad6 是否与 R-Smads 相互作用并干扰其与 Smad4 形成复合物, 抑制 R-Smad 的磷酸化机制作进一步验证, 也未对非 Smad 依赖途径如 Erk、SAPK/JNK 和 p38 MAPK 通路, 以及与肾间质纤维化相关的其他通路如: Wnt/ β -catenin 信号通路作进一步研究。此外, 本次研究数据略显不足, 后续将进一步针对以上不足扩大研究范围, 进行更加深入的研究, 为中药虎杖治疗肾间质纤维化提供更加具体的干预环节和治疗靶点, 为开发肾间质纤维化的新药提供新思路。

参 考 文 献 (References)

- [1] 上海市肾内科临床质量控制中心专家组. 慢性肾脏病早期筛查, 诊断及防治指南 (2022 年版) [J]. 中华肾脏病杂志, 2022, 38(5): 453-464.
Expert Group of Shanghai Nephrology Clinical Quality Control Center. Guideline for screening, diagnosis, prevention and treatment of chronic kidney disease (2022 edition) [J]. Chin J Nephrol, 2022, 38(5): 453-464.
- [2] Ammirati AL. Chronic kidney disease [J]. Rev Assoc Med Bras, 2020, 66: s03-s09.
- [3] Saleh MA, Awad AM, Ibrahim TM, et al. Small-dose sunitinib modulates p53, Bcl-2, STAT3, and ERK1/2 pathways and protects against adenine-induced nephrotoxicity [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(11): 397.
- [4] Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819-1834.
- [5] 王珊. 基于数据挖掘探讨付滨教授运用和法治疗慢性肾脏病的用药规律 [D]. 天津: 天津中医药大学; 2020.
Wang S. Research on the prescription pattern of professor fubin in treatment for chronic kidney disease by harmonization method based on data mining [D]. Tianjin: Tianjin Chinese Medical University; 2020.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China. Vol I. [M]. Beijing: China Medical Science Press; 2020.

- [7] 赵静, 孙伟. 孙伟教授治疗慢性肾脏疾病经验集萃 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(4): 286–287.
- Zhao J, Sun W. Highlights of professor sun wei's experience in treating chronic kidney disease [J]. Chin J Integr Tradit Western Nephrol, 2022, 23(4): 286–287.
- [8] 张云婷, 黄晓, 陈运中, 等. 虎杖主要化学成分及其生物合成机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(18): 4364–4372.
- Zhang YT, Huang X, Chen YZ, et al. Chemical constituents and their biosynthesis mechanisms of *Polygonum cuspidatum* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(18): 4364–4372.
- [9] 王达利, 孟凤仙, 商学征, 等. 虎杖有效成分对 DN 模型小鼠肾组织病理改变的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(4): 441–445.
- Wang DL, Meng FX, Shang XZ, et al. Effects of Active ingredients of *Polygonum cuspidatum* on pathological changes of kidney tissue in DN model mice [J]. J Tianjin Univ of Tradit Chin Med, 2020, 39(4): 441–445.
- [10] 徐小惠, 郑妮. 虎杖苷通过 TLR4/NF- κ B 信号通路调控糖尿病肾病大鼠肾脏炎症作用的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(16): 1677–1680.
- Xu XH, Zheng N. Polydatin protects diabetic nephropathy rats from renal inflammation by regulating the TLR4/NF- κ B signal pathway [J]. Chin J Hosp Pharm, 2018, 38(16): 1677–1680.
- [11] 凌启波. 实用病理特殊染色和组织化学技术 [M]. 广州: 广东高等教育出版社; 1989.
- Ling QB. Practical special staining and histochemical techniques for pathology [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press; 1989.
- [12] 张威, 朱小兰, 王朝杰, 等. 改良 Masson 染色法在肾穿刺活检组织染色中的应用 [J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(6): 375–376.
- Zhang W, Zhu XL, Wang CJ, et al. Application of modified Masson staining method in staining of kidney puncture biopsy tissue [J]. Chin J Pathol, 2005, 34(6): 375–376.
- [13] Wang YJ, Chen YY, Hsiao CM, et al. Induction of autophagy by pterostilbene contributes to the prevention of renal fibrosis via attenuating NLRP3 inflammasome activation and epithelial-mesenchymal transition [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 436.
- [14] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis; therapeutic translation for fibrotic disease [J]. Nat Med, 2012, 18(7): 1028–1040.
- [15] 冯浩杰, 张占红, 杜秋沛, 等. 上皮间质转化与器官纤维化 [J]. 生理科学进展, 2022, 53(1): 51–56.
- Feng HJ, Zhang ZH, Du QP, et al. Epithelial-mesenchymal transition and organ fibrosis [J]. Prog Physiol Sci, 2022, 53(1): 51–56.
- [16] Kim MK, Maeng YI, Sung WJ, et al. The differential expression of TGF- β 1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis; an immunohistochemical study [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(9): 1747–1758.
- [17] Avila-Carrasco L, Majano P, Sánchez-Tomé JA, et al. Natural plants compounds as modulators of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Front Pharmacol. 2019, 10: 715.
- [18] Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, et al. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling [J]. Genes Cells, 2002, 7(12): 1191–1204.
- [19] Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis; a review of animal models and therapeutic strategies [J]. In Vivo, 2017, 31(1): 1–22.
- [20] Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats [J]. Nephron, 1986, 44(3): 230–234.
- [21] Okabe C, Borges RL, de Almeida DC, et al. NF- κ B activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(2): F155–F163.
- [22] 江铭倩, 王利, 彭文, 等. 黄芪汤抗肾纤维化机制探讨 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(7): 733–736.
- Jiang MQ, Wang L, Peng W, et al. Discussion on the mechanism of astragalus decoction against renal fibrosis [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2016, 36(7): 733–736.

[收稿日期] 2022-09-26