

穿心莲内酯对膜性肾病大鼠肾纤维化的影响及其机制研究[△]

周靖^{1*}, 郭洋洋², 陆春红¹, 黄金杰¹, 王丹¹ (1. 开滦总医院肾内科, 河北唐山 063000; 2. 廊坊市第四人民医院内二科, 河北廊坊 065700)

中图分类号 R96;R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)09-1075-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.09.012

摘要 目的:探讨穿心莲内酯对膜性肾病(MN)大鼠的保护作用。方法:选取清洁级健康雄性SD大鼠80只,设为正常组、模型组、穿心莲内酯组(穿心莲内酯50 mg/kg)和贝那普利组(盐酸贝那普利10 mg/kg),每组20只。模型组、穿心莲内酯组和贝那普利组大鼠通过尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白建立MN大鼠模型。穿心莲内酯组、贝那普利组大鼠分别连续4周灌胃给药,1日1次;正常组和模型组大鼠连续4周灌胃给予0.9%氯化钠溶液,1日1次。采用生化分析法检测肾功能指标水平;通过苏木精-伊红染色、Masson染色行肾组织病理学检查,通过透射电子显微镜(TEM)观察肾组织超微结构变化;采用酶联免疫吸附试验检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)含量;采用蛋白质印迹法检测蛋白表达水平。结果:与模型组相比,穿心莲内酯组、贝那普利组大鼠肾组织病变和超微结构病变均明显减轻,其中穿心莲内酯组效果更为显著;24 h尿蛋白定量和肌酐(SCr)水平明显降低;TNF- α 、IL-6和ICAM-1含量明显降低;Toll样受体4(TLR4),核因子 κ B(NF- κ B),转化生长因子 β 1(TGF- β 1),磷酸化Smad2、磷酸化Smad3, I型和III型胶原蛋白表达量明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。且穿心莲内酯组大鼠上述指标水平明显优于贝那普利组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:穿心莲内酯对MN大鼠肾纤维化具有抑制作用,可能与抑制TLR4/NF- κ B通路和TGF- β 1/Smad通路,降低炎症反应和细胞外基质生成有关。

关键词 穿心莲内酯;膜性肾病;纤维化;TLR4/NF- κ B通路;TGF- β 1/Smad通路

Effects of Andrographolide on Renal Fibrosis in Rats with Membranous Nephropathy and Its Mechanism[△]

ZHOU Jing¹, GUO Yangyang², LU Chunhong¹, HUANG Jinjie¹, WANG Dan¹ (1. Dept. of Nephrology, Kailuan General Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Dept. of Internal Medicine, the Fourth People's Hospital of Langfang, Hebei Langfang 065700, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the protective effects of andrographolide on membranous nephropathy (MN) in rats. **METHODS:** Eighty clean healthy male SD rats were divided into the normal group, model group, andrographolide group (andrographolide 50 mg/kg) and benazepril group (benazepril hydrochloride 10 mg/kg), with 20 rats in each group. Rats in the model group, andrographolide group, benazepril group were injected with cationized bovine serum albumin through the tail vein to replicate the MN rat model. The andrographolide group and benazepril group were given intragastric administration once a day for four consecutive weeks. The normal group and model group were given 0.9% sodium chloride solution by gavage once a day for four consecutive weeks. The renal function indicators were detected by biochemical analysis method. Histopathological examination of renal tissue was performed by Hematoxylin-Eosin staining and Masson staining, and ultrastructural changes of renal tissue were observed by transmission electron microscopy (TEM). The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, the expression of proteins were detected by Western blot. **RESULTS:** Compared with the model group, the renal tissue lesions and ultrastructural lesions in the andrographolide group and benazepril group decreased significantly, and the effect of the andrographolide group was more significant; the 24 h urine protein quantification and creatinine (SCr) levels decreased significantly; the contents of TNF- α , IL-6 and ICAM-1 decreased significantly; the expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor κ B (NF- κ B), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), phosphorylated Smad2 and phosphorylated Smad3, collagen type I and type III decreased significantly, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The above indicators in the andrographolide group were significantly better than those in the benazepril group, with statistically significant differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Andrographolide has an inhibitory effect on renal fibrosis in MN rats, which may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B pathway and TGF- β 1/Smad pathway, reduction of inflammatory response and extracellular matrix production.

KEYWORDS Andrographolide; Membranous nephropathy; Fibrosis; TLR4/NF- κ B pathway; TGF- β /Smad pathway

[△] 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(No. 20201370);河北省唐山市科学技术研究与发展计划项目(No. 19130237C)

* 副主任医师,硕士。研究方向:慢性肾脏病。E-mail: hdsyywj@163.com

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)为成人肾病综合征的常见病理类型,以肾小球基底膜增厚及上皮下免疫复合物弥漫性沉积为主要病理特征。MN约占原发性肾小球疾病的10%,其中约30%的患者可自行缓解,但约40%的患者在发病10年内发展为终末期肾病^[1]。MN发病机制复杂,其中肾纤维化在MN疾病进展过程中发挥着重要作用^[2-3]。穿心莲内酯是传统中药穿心莲的主要活性成分,具有抗炎、抗病毒等多种药理作用^[4-5]。有研究表明,穿心莲内酯对四氯化碳所致肝纤维化、博来霉素所致肺纤维化均具有明显的抑制作用^[6-7]。但穿心莲内酯对MN的影响尚未见文献报道。本研究旨在探讨穿心莲内酯对MN大鼠肾纤维化的影响及相关机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性SD大鼠80只,体重210~240g,由河北医科大学实验动物学部提供[SCXK(冀)2018-004],清洁环境(温度为23~25℃,湿度为55%~65%)饲养,自由饮水进食。实验方案经开滦总医院伦理委员会审查批准。

1.2 仪器

CL-8000型生化分析仪(日本Shimadzu公司);UF-1000i型尿液分析仪(日本SYSMEX公司);RT-6000型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);JEM1400 Flash型透射电镜(日本JEOL公司);RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司);164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司);DYCZ-40D型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 药品与试剂

阳离子化牛血清白蛋白购自北京索莱宝生物科技有限公司(批号:SA8130);弗氏不完全佐剂购自美国Sigma公司(批号:P6556);穿心莲内酯购自广东万年青制药股份有限公司(批号:202005018);盐酸贝那普利购自成都地奥制药集团有限公司(批号:201006);肌酐(SCr)试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:200109);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、Masson染色试剂盒及增强型化学发光液(ECL)超敏发光试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(批号:G1120、G1340及SW2030);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)酶联免疫吸附试验检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:200105、200413及200407);Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、磷酸化Smad2、磷酸化Smad3、I型胶原蛋白、III型胶原蛋白、 β -肌动蛋白(β -actin)和免疫球蛋白G二抗购自北京博奥森生物科技有限公司(货号:bs-20595R、bs-20355R、bs-0086R、bs-2224R、bs-23581R、bs-975R、bs-0837R、bs-0061R和bs-0295G)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组、模型制备与给药:(1)分组。适应性饲养1周后,将80只大鼠随机分为正常组、模型组、穿心莲内酯组(穿心莲内酯50mg/kg)和贝那普利组(盐酸贝那普利10mg/kg),各20只。(2)造模。参照文献报道的方法,将20mg阳离子化牛血清白蛋白溶于0.9%氯化钠溶液30mL中,加入等量弗氏不完全佐剂并充分乳化,于双腋下和双腹股沟2日1次、共3次皮下注射乳化液1mL,进行预免疫;尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白16mg/kg进行正式免疫(2日

1次,共15次);通过尿蛋白试纸检测,结果为尿蛋白阳性即可判定造模成功^[8-9]。(3)给药。穿心莲内酯组和贝那普利组大鼠分别连续4周灌胃给药,1日1次;正常组和模型组连续4周灌胃给予0.9%氯化钠溶液,1日1次。

1.4.2 肾功能指标水平检测:给药完成后,每组随机取10只大鼠,收集24h尿液,通过磺基水杨酸法测定24h尿蛋白定量;麻醉,经腹主动脉取血并离心取血清,然后按照试剂盒说明书依步进行处理,通过全自动生化分析仪测定SCr含量。

1.4.3 通过HE、Masson染色进行肾组织病理学检查:采血完成后,颈椎脱臼处死大鼠,在冰上取双侧肾组织,左侧肾脏置于4%甲醛溶液固定3d、常规脱水和透明处理后,石蜡包埋、切片(厚度5 μ m),按照试剂盒说明书进行HE染色和Masson染色,然后通过光学显微镜观察肾组织病理学改变和纤维化状况(Masson染色图片中蓝色为胶原着色)。通过图像分析软件计算胶原容积分数(CVF)。

1.4.4 通过透射电子显微镜(TEM)观察肾组织超微结构变化:取右侧肾脏,经4℃、0.9%氯化钠溶液冲洗干净后置入浓度为3%的戊二醛溶液(pH=7.4)中固定3d,以蔗糖缓冲液清洗、1%锇酸固定1h、乙醇和丙酮混合液梯度脱水后进行包埋,60nm厚度超薄切片后,经醋酸铀避光染色10min、柠檬酸铅染色10min后,通过TEM观察肾组织超微结构变化。

1.4.5 采用酶联免疫吸附试验检测肾组织TNF- α 、IL-6和ICAM-1含量:取各组剩余的10只大鼠,麻醉后颈椎脱臼处死,在冰上取双侧肾脏,左侧肾脏剪碎、按1:8的质量体积比加入4℃预冷裂解液、匀浆处理后,冰上静置1h使其充分裂解,4℃离心(半径10cm,转速3500r/min,时间10min)取上清液,按照酶联免疫吸附试验试剂盒操作方法处理后,通过酶标仪检测TNF- α 、IL-6和ICAM-1含量。

1.4.6 采用蛋白质印迹法检测肾组织TLR4、NF- κ B、TGF- β 1、磷酸化Smad2、磷酸化Smad3、I型和III型胶原蛋白表达水平:取右侧肾脏,参照“1.4.5”项下方法进行肾脏组织匀浆、裂解,4℃、12000r/min(离心半径10cm)离心取上清液,测定总蛋白后以30 μ g蛋白量上样、凝胶电泳(80V,40min;160V,90min)分离蛋白、湿法转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(300mA,90min),5%脱脂奶粉常温封闭90min后,加目标蛋白[TLR4(1:1000)、NF- κ B(1:1000)、TGF- β 1(1:1000)、磷酸化Smad2(1:800)、磷酸化Smad3(1:800)、I型胶原蛋白(1:1000)、III型胶原蛋白(1:1000)]和 β -actin(1:2000)一抗4℃孵育12h, TBST洗膜后加二抗(1:3000)37℃孵育1h, TBST洗膜后加ELC发光剂,通过凝胶成像仪显示蛋白条带,以 β -actin为内参、通过条带灰度值半定量目标蛋白表达。

1.5 统计学方法

运用SPSS 21.0软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用one-way ANOVA,两组间比较采用LSD-t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 穿心莲内酯对MN大鼠24h尿蛋白定量和血清SCr含量的影响

模型组大鼠24h尿蛋白定量和血清SCr含量均明显高于正常组($P<0.01$);穿心莲内酯组和贝那普利组24h尿蛋白定

量和血清 SCr 含量均明显低于模型组 ($P < 0.01$); 穿心莲内酯组 24 h 尿蛋白定量和血清 SCr 含量均明显低于贝那普利组 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见表 1。

表 1 穿心莲内酯对 MN 大鼠 24 h 尿蛋白定量和血清 SCr 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of andrographolide on 24 h urinary protein quantification and serum SCr in MN rats ($\bar{x} \pm s$)

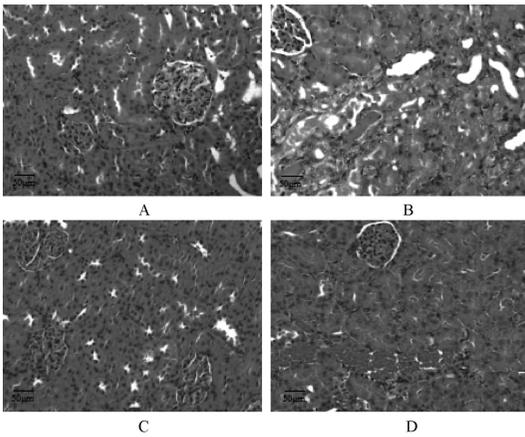
组别	24 h 尿蛋白定量/(mg/24 h)	SCr/($\mu\text{mol/L}$)
正常组 ($n=10$)	9.64 \pm 1.31	26.17 \pm 3.44
模型组 ($n=10$)	24.85 \pm 3.79**	51.93 \pm 5.92**
穿心莲内酯组 ($n=10$)	12.27 \pm 2.60 ^{##} Δ	35.08 \pm 3.71 ^{##} Δ
贝那普利组 ($n=10$)	15.04 \pm 2.83 ^{##}	40.16 \pm 4.35 ^{##}

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与贝那普利组比较, Δ $P < 0.05$

Note: vs. the normal group, ** $P < 0.01$; vs. the model group, ^{##} $P < 0.01$; vs. the benazepril group, Δ $P < 0.05$

2.2 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织病变的影响

HE 染色和 Masson 染色结果显示, 正常组大鼠肾组织形态结构未见异常; 模型组大鼠可见肾细胞固缩、肾间质炎细胞浸润、肾小球及间质区大量胶原沉积等病理学改变; 与模型组比较, 穿心莲内酯组和贝那普利组肾组织病变均明显减轻, 肾小球和肾间质仅可见丝状胶原沉积, 其中穿心莲内酯组效果更为显著, 见图 1—2。模型组的 CVF 明显高于正常组 [(23.71 \pm 3.80)% vs. (9.54 \pm 1.29)%], $P < 0.01$; 穿心莲内酯组、贝那普利组的 CVF 明显低于模型组 [(12.09 \pm 2.41)% vs. (23.71 \pm 3.80)%], (15.38 \pm 2.75)% vs. (23.71 \pm 3.80)%], $P < 0.01$; 穿心莲内酯组的 CVF 明显低于贝那普利组 [(12.09 \pm 2.41)% vs. (15.38 \pm 2.75)%], $P < 0.05$], 上述差异均有统计学意义。



A. 正常组; B. 模型组; C. 穿心莲内酯组; D. 贝那普利组

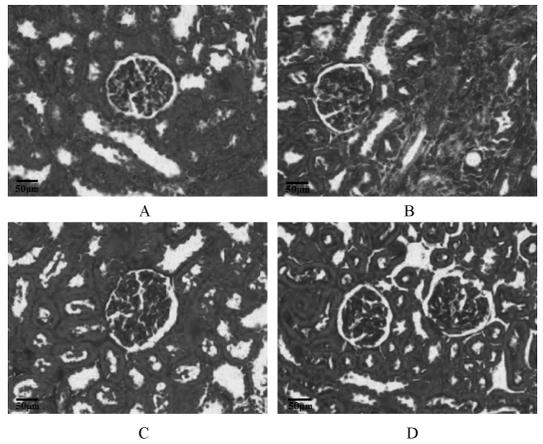
A. normal group; B. model group; C. andrographolide group; D. benazepril group

图 1 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织病变的影响 (HE 染色)

Fig 1 Effects of andrographolide on renal tissue lesions in MN rats (HE staining)

2.3 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织超微结构病变的影响

正常组肾组织基底膜、足突形态正常, 上皮未见电子致密物沉淀; 模型组肾组织可见基底膜不规则增厚, 足突排列紊乱、部分消失或融合, 上皮可见大量电子致密物沉积等超微结构病变; 与模型组比较, 穿心莲内酯组和贝那普利组肾组织超微结构病变均明显减轻, 其中穿心莲内酯组效果更为显著, 见图 3。

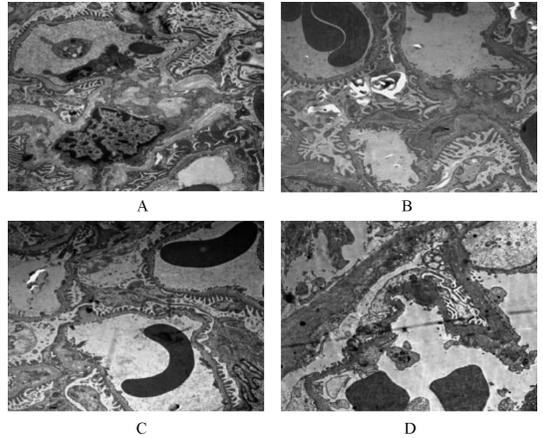


A. 正常组; B. 模型组; C. 穿心莲内酯组; D. 贝那普利组

A. normal group; B. model group; C. andrographolide group; D. benazepril group

图 2 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织纤维化的影响 (Masson 染色)

Fig 2 Effects of andrographolide on renal tissue fibrosis in MN rats (Masson staining)



A. 正常组; B. 模型组; C. 穿心莲内酯组; D. 贝那普利组

A. normal group; B. model group; C. andrographolide group;

D. benazepril group

图 3 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织超微结构变化的影响 ($\times 10\ 000$)

Fig 3 Effects of andrographolide on ultrastructural changes of renal tissue in MN rats ($\times 10\ 000$)

2.4 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 含量的影响

模型组的 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 含量明显高于正常组 ($P < 0.01$); 穿心莲内酯组和贝那普利组的 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 含量均明显低于模型组 ($P < 0.01$); 穿心莲内酯组的 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 含量明显低于贝那普利组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 上述差异均有统计学意义, 见表 2。

2.5 穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平的影响

模型组大鼠肾组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平明显高于正常组 ($P < 0.01$); 穿心莲内酯组和贝那普利组 TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平明显低于模型组 ($P < 0.01$); 穿心莲内酯组 TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平明显低于贝那普利组 ($P < 0.01$),

上述差异均有统计学意义,见图4、表3。

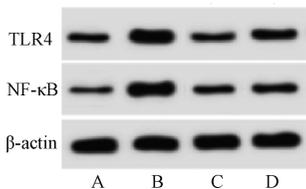
表2 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织TNF- α 、IL-6和ICAM-1含量的影响($\bar{x}\pm s$, ng/g)

Tab 2 Effects of andrographolide on contents of TNF- α , IL-6, ICAM-1 in renal tissue of MN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF- α	IL-6	ICAM-1
正常组(n=10)	10.38 \pm 1.16	17.52 \pm 1.84	5.74 \pm 0.86
模型组(n=10)	41.25 \pm 5.37**	58.47 \pm 6.92**	20.59 \pm 2.73**
穿心莲内酯组(n=10)	18.71 \pm 3.24 ^{##$\Delta\Delta$}	26.05 \pm 3.86 ^{##Δ}	9.36 \pm 1.52 ^{##$\Delta\Delta$}
贝那普利组(n=10)	24.69 \pm 4.18 ^{##}	32.70 \pm 4.31 ^{##}	13.15 \pm 1.94 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与贝那普利组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

Note:vs. the normal group, ** $P<0.01$; vs. the model group, ^{##} $P<0.01$; vs. the benazepril group, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$



A. 正常组; B. 模型组; C. 穿心莲内酯组; D. 贝那普利组
A. normal group; B. model group; C. andrographolide group; D. benazepril group

图4 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织TLR4、NF- κ B蛋白表达水平的影响

Fig 4 Effects of andrographolide on expressions of TLR4, NF- κ B protein in renal tissue of MN rats

表3 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织TLR4、NF- κ B蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of andrographolide on expressions of TLR4, NF- κ B protein in renal tissue of MN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	TLR4/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
正常组(n=10)	0.22 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02
模型组(n=10)	1.07 \pm 0.18**	1.03 \pm 0.16**
穿心莲内酯组(n=10)	0.29 \pm 0.06 ^{##$\Delta\Delta$}	0.20 \pm 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}
贝那普利组(n=10)	0.72 \pm 0.12 ^{##}	0.53 \pm 0.09 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与贝那普利组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

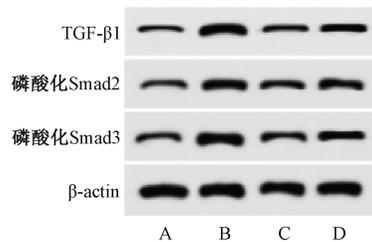
Note:vs. the normal group, ** $P<0.01$; vs. the model group, ^{##} $P<0.01$; vs. the benazepril group, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

2.6 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织TGF- β 1、磷酸化Smad2和磷酸化Smad3蛋白表达水平的影响

模型组大鼠肾组织TGF- β 1、磷酸化Smad2和磷酸化Smad3蛋白表达水平明显高于正常组($P<0.01$);穿心莲内酯组和贝那普利组TGF- β 1、磷酸化Smad2和磷酸化Smad3蛋白表达水平明显低于模型组($P<0.01$);穿心莲内酯组TGF- β 1、磷酸化Smad2和磷酸化Smad3蛋白表达水平明显低于贝那普利组($P<0.01$),上述差异均有统计学意义,见图5、表4。

2.7 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织I型和III型胶原蛋白表达水平的影响

模型组大鼠肾组织I型和III型胶原蛋白表达水平明显高于正常组($P<0.01$);穿心莲内酯组和贝那普利组I型和III型胶原蛋白表达水平明显低于模型组($P<0.01$);穿心莲内酯组I型和III型胶原蛋白表达水平明显低于贝那普利组($P<0.01$),上述差异均有统计学意义,见图6、表5。



A. 正常组; B. 模型组; C. 穿心莲内酯组; D. 贝那普利组
A. normal group; B. model group; C. andrographolide group; D. benazepril group

图5 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织TGF- β 1、磷酸化Smad2和磷酸化Smad3蛋白表达水平的影响
Fig 5 Effects of andrographolide on expressions of TGF- β 1, phosphorylated Smad2, phosphorylated Smad3 protein in renal tissue of MN rats

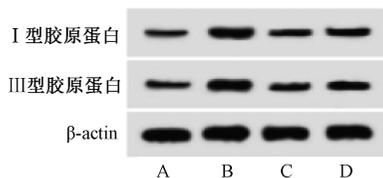
表4 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织TGF- β 1、磷酸化Smad2、磷酸化Smad3蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effects of andrographolide on expressions of TGF- β 1, phosphorylated Smad2, phosphorylated Smad3 protein in renal tissue of MN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	TGF- β 1/ β -actin	磷酸化Smad2/ β -actin	磷酸化Smad3/ β -actin
正常组(n=10)	0.12 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03
模型组(n=10)	1.02 \pm 0.15**	0.91 \pm 0.13**	0.98 \pm 0.16**
穿心莲内酯组(n=10)	0.18 \pm 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}	0.23 \pm 0.05 ^{##$\Delta\Delta$}	0.25 \pm 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}
贝那普利组(n=10)	0.41 \pm 0.08 ^{##}	0.54 \pm 0.10 ^{##}	0.43 \pm 0.07 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与贝那普利组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

Note:vs. the normal group, ** $P<0.01$; vs. the model group, ^{##} $P<0.01$; vs. the benazepril group, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$



A. 正常组; B. 模型组; C. 穿心莲内酯组; D. 贝那普利组
A. normal group; B. model group; C. andrographolide group; D. benazepril group

图6 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织I型和III型胶原蛋白表达水平的影响

Fig 6 Effects of andrographolide on expressions of type I and type III collagen protein in renal tissue of MN rats

表5 穿心莲内酯对MN大鼠肾组织I型和III型胶原蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 5 Effects of andrographolide on expressions of type I and type III collagen protein in renal tissue of MN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	I型胶原蛋白/ β -actin	III型胶原蛋白/ β -actin
正常组(n=10)	0.14 \pm 0.03	0.18 \pm 0.04
模型组(n=10)	0.68 \pm 0.11**	0.61 \pm 0.09**
穿心莲内酯组(n=10)	0.21 \pm 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}	0.20 \pm 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}
贝那普利组(n=10)	0.37 \pm 0.06 ^{##}	0.32 \pm 0.05 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与贝那普利组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

Note:vs. the normal group, ** $P<0.01$; vs. the model group, ^{##} $P<0.01$; vs. the benazepril group, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

3 讨论

MN 是成人肾病综合征的主要致病因素,具有高发病率和高风险性,并呈现年轻化趋势,严重威胁着人们的生命健康。有研究结果发现,MN 患者并发肾纤维化的比例>60%^[10]。蔡小凡等^[11]的研究结果表明,肾纤维化发生程度是决定肾脏疾病预后的重要因素,抑制纤维化能够有效延缓 MN 向终末期的转变。目前,临床上对于 MN 的治疗主要采取糖皮质激素联合免疫抑制剂的方案^[12-13]。但肾纤维化得不到很好的控制,是 MN 治疗中仍待解决的难题。

中医药在我国具有悠久的历史,MN 在中医属于“尿浊”“水肿”等范畴,其病机在于“脾肾亏虚,水湿、痰浊、瘀血、浊毒潜藏肾络”,日久则肾络癥积,形成肾纤维化^[14]。穿心莲属于爵床科穿心莲属一年生草本植物,其干燥地上部分入药,性寒、味苦,具有清热解毒、凉血消肿的功效。穿心莲内酯为穿心莲的主要活性成分,属于二萜类内酯化合物,具有抗炎、免疫调节等多种生物学活性,对急性肾衰竭、糖尿病肾病和原发性肾病综合征等多种肾脏疾病具有治疗作用^[15-16]。此外, Das 等^[17]的研究结果发现,穿心莲内酯能够通过抑制 NF- κ B 通路抑制肾炎小鼠肾组织纤维化。贝那普利为血管紧张素转换酶抑制剂,能够明显改善 MN 大鼠的肾功能,降低尿蛋白量,是 MN 动物实验研究常用的阳性对照药物^[18]。本研究通过尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白制备 MN 大鼠模型,24 h 尿蛋白定量和血清 SCr 含量明显升高,肾组织呈现细胞固缩、炎症浸润、肾小球及间质区大量胶原沉积等病理学改变,并可见基底膜不规则增厚、足突排列紊乱、部分消失或融合、上皮可见大量电子致密物沉积等超微结构病变,与高飞等^[19]的研究结果一致。进一步研究发现,经穿心莲内酯或贝那普利治疗能够明显降低 24 h 尿蛋白定量和 SCr 含量,明显改善组织病变和超微结构病变,且穿心莲内酯(50 mg/kg)的效果优于贝那普利(10 mg/kg),提示穿心莲内酯对 MN 大鼠肾组织纤维化等病变具有抑制作用,对肾功能具有改善作用。

TGF- β 1 为强致纤维化因子,与肾纤维化密切相关^[20]。Jurčić 等^[21]发现,上调细胞外基质(ECM)蛋白表达能促进组织纤维化,而 ECM 的生成需要 I 型和 III 型胶原蛋白^[22]。Meng 等^[23]的研究结果发现,磷酸化 Smad2、磷酸化 Smad3 能够上调 I 型和 III 型胶原蛋白表达,而 Smads 为 TGF- β 1 下游靶分子。本研究结果显示,经穿心莲内酯或贝那普利治疗能够明显下调 MN 大鼠肾组织 TGF- β 1、磷酸化 Smad2、磷酸化 Smad3、I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白表达,穿心莲内酯(50 mg/kg)的效果优于贝那普利(10 mg/kg),这可能是穿心莲内酯抑制 MN 大鼠肾纤维化的重要机制。

肾纤维化机制复杂,多种因素参与其病理进展过程。MN 所致肾脏免疫微环境改变,肾小球细胞、肾间质细胞和系膜细胞等释放 TNF- α 、IL-6 及 ICAM-1 等炎症细胞因子,致使肾间质炎症细胞浸润而引发炎症反应。杨霜等^[24]和郑铁骑等^[25]的研究结果发现,炎症反应能够促进肾细胞表型转化,进而释放肾毒性因子、生长因子等,促进肾纤维化。IL-6 主要由系膜细胞释放,能够促进 EMC 生成。高雅婵等^[26]的研究结果发现,IL-6 的促纤维化作用与 IL-6 含量呈正相关。TNF- α 具有炎症趋化因子属性,能够进一步促进炎症细胞因子释放,并促

进前列腺素、单核细胞趋化蛋白-1 等表达,促进 ICAM-1 表达与释放而增加内皮通透性和炎症细胞浸润,从而促进肾纤维化进展^[27]。Toll 样受体(TLR)是一类跨膜识别受体,在机体免疫应答及炎症反应调节过程中发挥着重要的信号传导作用;NF- κ B 为 TLR4 下游靶基因,能够被 TLR4 诱导表达与活化,活化 NF- κ B 核转位后能够诱导 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 等炎症因子释放,从而加重炎症反应^[28]。因此,TLR4/NF- κ B 信号通路在炎症反应过程中具有重要调控作用。本研究结果显示,经穿心莲内酯或贝那普利治疗能够明显降低 MN 大鼠肾组织 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 含量,下调 TLR4、NF- κ B 表达,与 Li 等^[29]的研究结果一致,且穿心莲内酯(50 mg/kg)的效果优于贝那普利(10 mg/kg),提示穿心莲内酯对 MN 大鼠的炎症反应具有抑制作用,从而间接抑制肾纤维化,其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

综上所述,穿心莲内酯对 MN 大鼠肾纤维化具有抑制作用,可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路和 TGF- β 1/Smad 通路,进而抑制炎症反应和细胞外基质生成有关。本研究结果为穿心莲内酯作为 MN 治疗备选药物提供了理论支持。

参考文献

- [1] 韦翠美,李彤,胡豪飞.膜性肾病流行病学及相关因素[J].国际泌尿系统杂志,2018,38(5):872-875.
- [2] LI T T, ZHANG X H, JING J F, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates the proteinuria and renal fibrosis in rat experimental membranous nephropathy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(2): 188-199.
- [3] CONSERVA F, BAROZZINO M, PESCE F, et al. Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of kidney fibrosis in diabetic nephropathy[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11357.
- [4] GUPTA S, MISHRA K P, KUMAR B, et al. Andrographolide attenuates complete freund's adjuvant induced arthritis via suppression of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 261: 113022.
- [5] GUPTA S, MISHRA K P, KUMAR B, et al. Andrographolide mitigates unfolded protein response pathway and apoptosis involved in chikungunya virus infection[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2021, 24(6): 849-859.
- [6] 谢婧,李丽华.脱水穿心莲内酯对四氯化碳诱导的肝纤维化模型小鼠肝细胞凋亡的抑制作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2019,45(5):1009-1014,1193-1194.
- [7] 黄成亮,王文军,朱惠兰,等.穿心莲内酯对博来霉素致肺纤维化大鼠肺组织羟脯氨酸和 PDGF 表达的影响[J].时珍国医国药,2012,23(4):904-907.
- [8] 彭素英,王玉洁,何宇,等.阳离子化牛血清白蛋白膜性肾病大鼠模型的建立与鉴定[J].山东医药,2016,56(48):36-38.
- [9] 陈素枝,臧倩男,张卓,等.益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及足细胞骨架相关蛋白的影响[J].中草药,2018,49(20):4857-4863.
- [10] 李欣航,占永立.伴肾小管间质纤维化特发性膜性肾病临床病理及中医证型特征分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2019,20(10):863-866.
- [11] 蔡小凡,张晓丹,钟逸斐,等.肾病综合征特发性膜性肾病患者临床病理特征与肾功能的相关性[J].中国中西医结合肾病

杂志, 2020, 21(4): 317-320.

[12] 徐丽梨, 吴晓静, 李欣, 等. 糖皮质激素联合免疫抑制剂治疗特发性膜性肾病的疗效分析[J]. 上海医学, 2021, 44(11): 817-821.

[13] 刘国建, 鲍运霞, 张威, 等. 他克莫司联合糖皮质激素治疗特发性膜性肾病的临床观察[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2015, 49(5): 446-449.

[14] 赵华. 从正虚伏论治肾纤维化[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(7): 1098-1101.

[15] 姜永昌. 中药莲必治(穿心莲内酯)注射液致急性肾衰竭临床特点探析[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(3): 109-110.

[16] 李梦诗, 吴腾, 曹静桦, 等. 穿心莲内酯对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及机制[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 97-101.

[17] DAS S, PERIYASAMY R, PANDEY K N. Activation of IKK/NF- κ B provokes renal inflammatory responses in guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-a gene-knockout mice[J]. *Physiol Genomics*, 2012, 44(7): 430-442.

[18] LU H, LUO Y Z, SU B L, et al. Wenyang Lishui decoction ameliorates podocyte injury in membranous nephropathy rat and cell models by regulating p53 and Bcl-2[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 6813760.

[19] 高飞, 王泽泽, 杨冰, 等. 基于TLR4/NF- κ B信号通路探讨加味升降散对膜性肾病大鼠肾组织纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 46-54.

[20] LI Y, LI L, ZENG O, et al. H₂S improves renal fibrosis in STZ-induced diabetic rats by ameliorating TGF- β 1 expression[J]. *Ren Fail*, 2017, 39(1): 265-272.

[21] JURČIĆ P, RADULOVIĆ P, BALJA M P, et al. E-cadherin and

NEDD9 expression in primary colorectal cancer, metastatic lymph nodes and liver metastases[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 2881-2889.

[22] LI R, GUO Y, ZHANG Y, et al. Salidroside ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TLR4/NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1103.

[23] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.

[24] 杨霜, 王丽, 樊均明. TLR4及其信号通路参与肾纤维化机制研究进展[J]. 医学研究生学报, 2019, 32(2): 216-220.

[25] 郑铁骑, 邢翔飞. 细胞因子与肾间质纤维化相关性的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(6): 107-109, 110.

[26] 高雅婵, 何立群. 肾病1号方加减对肝肾阴虚型重症IgA肾病患者临床疗效及肾纤维化机制指标的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(6): 1140-1143.

[27] 董福兴. 益赛普介导TNF- α 调控UUO小鼠肾组织C3在肾间质纤维化中的作用机制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(3): 267-272.

[28] HAN W B, MA Q, LIU Y L, et al. Huangkui capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF- κ B signaling[J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 203-214.

[29] LI R, GUO Y J, ZHANG Y M, et al. Salidroside ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TLR4/NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1103.

(收稿日期:2022-01-17 修回日期:2022-04-26)

(上接第1074页)

过多个补血靶点调控磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B、缺氧诱导因子1等造血信号通路促进骨髓修复,发挥补血作用^[15]。

综上所述,复方皂矾丸联合rhG-CSF治疗肿瘤化疗后白细胞减少症的疗效显著,能有效提高白细胞数量,改善免疫功能,且安全性高。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 田劭丹, 董青, 祁烁, 等. 化疗后白细胞减少症中医药防治与评估专家共识[J]. 现代中医临床, 2018, 25(3): 1-6.

[3] 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会. 肿瘤化疗导致的中性粒细胞减少诊治专家共识(2019年版)[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(17): 876-882.

[4] 赵伟鹏, 李鹤, 姜欣, 等. 从“湿热内蕴, 郁遏卫阳”谈化疗后白细胞减少症的中医辨治[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(6): 1019-1021.

[5] 朱艳, 罗信国, 蒋志勇, 等. 复方皂矾丸联合重组人粒细胞刺激因子注射液对血液肿瘤化疗后白细胞减少的影响[J]. 新中医, 2019, 51(12): 193-196.

[6] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 162-165.

[7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 378-383.

[8] KANEMITSU Y, SHITARA K, MIZUSAWA J, et al. Primary tumor resection plus chemotherapy versus chemotherapy alone for colorectal cancer patients with asymptomatic, synchronous unresectable metastases (JCOG1007; iPACS): a randomized clinical trial[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(10): 1098-1107.

[9] 曾妙, 甘家丽, 黄培锋, 等. 中医药防治化疗后骨髓抑制疗效及药理机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(10): 213-216.

[10] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)肿瘤放疗化疗相关中性粒细胞减少症规范化治疗指南(2021)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(7): 638-648.

[11] 周莉, 张慧慧, 何柳婷, 等. T细胞组套检测对原发性免疫性血小板减少症病情预后及治疗药物选择的指导应用[J]. 中国临床研究, 2021, 34(9): 1194-1198.

[12] 谭思怡, 孟凡岩, 刘宝瑞. T淋巴细胞归巢: 实体肿瘤过继性细胞治疗的关键因素[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(2): 103-108.

[13] 武琳琳, 江慧敏, 李玲玲, 等. 不同治疗手段对骨髓增生异常综合征的临床疗效研究及相关因素分析[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2021, 18(4): 198-201.

[14] 荣瑞芬, 齐琳, 苏晨, 等. 核桃多糖研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(3): 11-21.

[15] 尚昱志, 李陈玲, 韦露秋, 等. 基于网络药理学的大枣补血机制初探[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(5): 58-62.

(收稿日期:2022-03-02 修回日期:2022-06-08)