

丹参总酚酸抑制大鼠肾间质纤维化的初步观察

尚雁君¹, 黄才国^{1*}, 蒋山好², 朱大元², 魏善建¹, 焦炳华¹, 李锴男³, 张建荣⁴

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学和分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 第四军医大学基础医学部病理学教研室, 西安 710033; 4. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 观察丹参总酚酸对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾间质纤维化的影响。**方法:** 将 40 只健康、雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 分别为 UUO 组、假手术组(SOR)、阳性对照依那普利(ACEI)组和丹参总酚酸样品(TSA)组, 术前分别给 UUO 组和 SOR 组灌生理盐水, ACEI 组和丹参总酚酸组分别灌胃 ACEI[6 mg/(kg·d)]和丹参总酚酸[20 mg/(kg·d)], 连续 8 d。术后第 7 天分别处死各组大鼠用免疫组织化学方法测定 TGF- β_1 的表达情况。行 H-E 和 Masson 染色, 动态观察肾间质病理学改变。**结果:** 丹参总酚酸组和 ACEI 组 TGF- β_1 的表达量与模型组(0.22±0.06)比较有明显的下降($P<0.05$), 结果分别是 1.38±0.26 和 1.38±0.26。丹参总酚酸能显著减少 UUO 大鼠肾小管间质 TGF- β_1 的表达, 减轻胶原在肾间质的沉积, 改善了肾脏病理改变。**结论:** 丹参总酚酸对 UUO 所致的大鼠肾脏纤维化的形成有明显的抑制作用, 其作用可能跟降低 TGF- β_1 的表达有关。

[关键词] 丹参总酚酸; 肾间质纤维化; 转化生长因子 β_1

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1295-04

Total salvianolic acid inhibiting renal interstitial fibrosis in rats

SHANG Yan-jun¹, HUANG Cai-guo^{1*}, JIANG Shan-hao², ZHU Da-yuan², WEI Shan-jian¹, JIAO Bing-hua¹, LI Kai-nan³, ZHANG Jian-rong⁴ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203; 3. Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Forth Military Medical University, Xi'an 710033; 4. Department of Experimental Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of total salvianolic acid(TSA) on the renal interstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats. **Methods:** Forty healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: the UUO group, sham-operation group, angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI)-treated group (positive control), and TSA-treated group. The rats in UUO group and sham-operation group received gastric gavage with normal saline for 8 days before operation; rats in ACEI-treated group and TSA-treated group received ACEI (6 mg/kg by daily gastric gavage for 8 days) and TSA (20 mg/kg by daily gastric gavage for 8 days), respectively. All rats were killed 7 days after operation and the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) was detected by immunohistochemical method. The dynamic histological changes of renal interstitial tissues were observed by H-E and Masson staining. **Results:** TGF- β_1 expression in TSA-treated (1.38±0.26) and ACEI-treated (1.38±0.26) groups was significantly lower than that in UUO group ($P<0.05$). TSA obviously reduced TGF- β_1 expression and collagen deposition in the renal interstitial tissues and improved the renal pathological changes in UUO rats. **Conclusion:** TSA can evidently inhibit UUO-induced renal interstitial fibrosis in rats, which might be related with the down regulation of TGF- β_1 expression.

[KEY WORDS] total salvianolic acid; renal interstitial fibrosis; transforming growth factor- β_1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1295-1298]

肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)是所有慢性肾脏疾病发展的最终结果,是导致终末期肾功能衰竭的主要原因之一。无论是各种原发性肾小球疾病,还是糖尿病、输尿管阻塞,肾功能的损害都与肾脏纤维化病变的程度密切相关。这些疾病能引起肾小管上皮细胞的凋亡、肾间质炎性细胞的浸润、肌成纤维细胞的聚集,并在一些促纤维化因子的参与下,使细胞外基质(ECM)生成增多、降

解减少,而产生肾间质纤维化,导致肾功能严重受损^[1]。近年来,各种细胞因子如转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介

[基金项目] 国家自然科学基金(29632050)。Supported by National Natural Science Foundation of China(29632050)。

[作者简介] 尚雁君,女,硕士生。E-mail:syjsmmu@163.com

* Corresponding author. E-mail:huangcaig@hotmail.com

素-1(IL-1)等在纤维化发生发展中的作用已被越来越多的人关注。尽管各种细胞因子的作用及其相关关系尚未完全明了,但已有资料证明:TGF- β_1 在各器官组织的纤维化疾病中发挥了十分重要的作用,被大多数学者公认为纤维化形成与发展的启动枢纽,是关键性细胞因子^[2]。

有人通过实验研究证明丹参对人肾成纤维细胞增殖有抑制作用,并通过使 C-Myc 蛋白高水平表达而诱导细胞凋亡;长期使用大量丹参治疗可能对肾炎的间质纤维化变有一定疗效,从而防止或减少瘢痕的影响,延缓尿毒症的发生^[3]。活血化瘀中药丹参已被证明有逆转肝纤维化有和心肌纤维化的作用^[4],也有文章对丹参注射液对大鼠梗阻性肾间质纤维化的保护作用做了研究^[5],但没有证明丹参总酚酸对肾纤维化的作用,本实验旨在研究丹参总酚酸对 UUO 大鼠肾纤维化的保护作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂 SD 大鼠,雄性,体质量 180~200 g;购于第二军医大学实验动物中心;马来酸依那普利(ACEI),扬子江药业集团生产,购于长海医院;兔抗大鼠 TGF- β_1 IH(P)免疫组化试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;丹参总酚酸由中国科学院上海药物所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物的分组及处理 将 40 只大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,单侧输尿管梗阻(UUO)组、假手术(SOR)组、阳性对照(ACEI)组和丹参总酚酸(TSA)组。

除 SOR 组外其他 3 组行单侧输尿管结扎,方法如下:用乙醚将大鼠麻醉后,再用 75%乙醇消毒,选择腹正中线切口稍偏左,依次切开皮肤至腹腔,游离肾脏及输尿管,将左侧输尿管用组织钳托起中段部位,止血钳夹住,在两端用 4-0 丝线结扎左侧输尿管近肾盂段及远端,在两个结扎点之间剪断输尿管。然后连续缝合皮肤。SOR 手术入路方式同 UUO 组,进腹腔后分离左输尿管但不结扎输尿管。经反复的预试验证明,大鼠输尿管在结扎 7 d 时正处于纤维化形成期,在此时用药效果较为明显。文献^[5]曾用 15 mg/(kg·d)丹参注射液治疗肾纤维化,我们通过预试验发现丹参总酚酸在剂量为 20 mg/(kg·d)时效果较好。于手术前 1 d 对 UUO、SOR 灌胃生理盐水,ACEI 和丹参总酚酸两组分别灌胃马来酸依那

普利[6 mg/(kg·d)]和丹参总酚酸[20 mg/(kg·d)]连续 8 d,于术后第 7 d 取左肾组织用 10%~15%甲醛固定,石蜡包埋^[6]。

1.2.2 肾组织病理学观察 左肾组织行 H-E 和 Masson 染色,光镜观察肾间质纤维化情况。

1.2.3 免疫组织化学检查 采用免疫组化的方法检测肾组织 TGF- β_1 ,操作步骤按试剂盒说明书进行。免疫组织化学结果定量:在每张切片不包含肾小球和血管的肾小管间质区域分别随机选取 10 个高倍镜视野,用计算机图像分析软件(HPIAS-1000 高清晰度彩色病理成像分析系统,第四军医大学病理学教研室提供)对所选视野内的免疫组化阳性信号进行计算机读片,以阳性染色面积占整个视野面积的百分比作半定量分析。

1.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,用 SAS 6.12 统计分析软件完成。

2 结果

2.1 病理学改变 H-E 和 Masson 染色显示,在 UUO 术后第 7 天,SOR 组结构正常,肾间质无改变,肾小管上皮细胞排列整齐,细胞结构完整,小管与小管之间间隙紧密,小管间质无炎性细胞浸润,小管基底膜光滑、连续;UUO 组间质大量炎性细胞浸润和纤维组织增生,部分肾小管萎缩、管腔闭塞或扩张、坏死,小管基底膜不同程度断裂增厚,小管壁变薄,小管上皮细胞结构破坏严重;TSA 组和 ACEI 组间质可见少量的炎性细胞浸润以及纤维组织增生,肾小管轻度扩张,部分肾小球轻度萎缩,肾小囊扩张,但还保留着一部分正常的小管和小球结构(图 1)。Masson 三色染色结果显示,SOR 组胶原染色主要位于小管基底膜及管周围,而肾小管间质染色较少。与 SOR 组比较 UUO 组术后第 7 天,肾小管扩张,肾间质明显增宽,间质浸润细胞增多,胶原成分增加。TSA 酸组和 ACEI 组肾间质纤维化程度较 UUO 组明显降低(图 2)。

2.2 TGF- β_1 检测结果 TGF- β_1 在肾间质的表达,在 SOR 组,TGF- β_1 主要表达部位为皮髓交界处肾间质,但 TGF- β_1 的表达较少(0.22 ± 0.06)。建模后第 7 天,UUO 组肾组织中 TGF- β_1 主要在肾间质中表达,且比 SOR 组明显增加(2.95 ± 0.36 , $P < 0.01$)。而 TSA 组和 ACEI 组 TGF- β_1 的表达量与 UUO 组比较有明显的下降($P < 0.05$),但仍比 SOR 组高,结果分别是 1.38 ± 0.26 和 1.38 ± 0.26 。

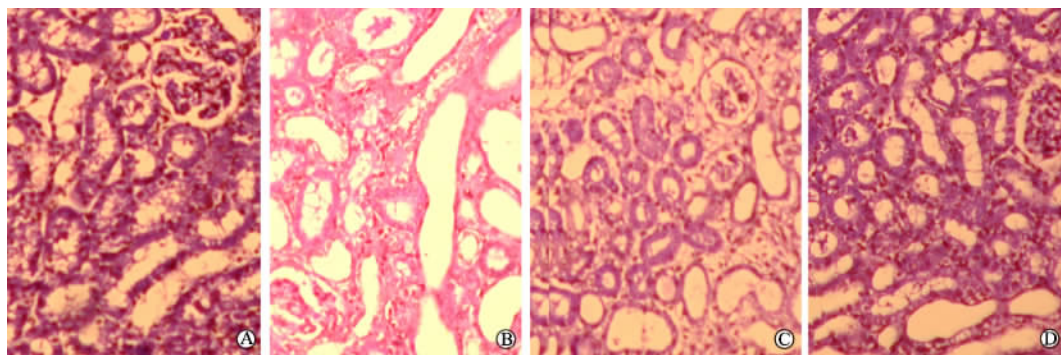


图 1 大鼠肾组织的 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of renal fiber tissue of rats($\times 40$)

A; SOR group; B; UUO group; C; ACEI group; D; TSA group

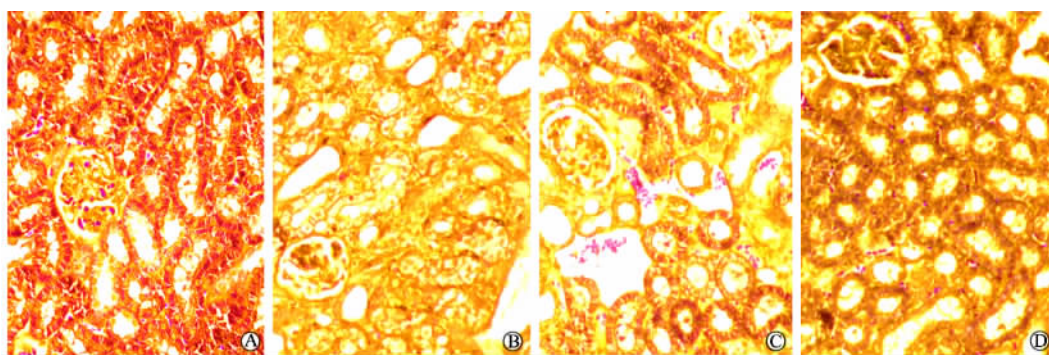


图 2 大鼠肾组织的 Masson 染色

Fig 2 Masson staining of renal fiber tissue of rats($\times 40$)

A; SOR group; B; UUO group; C; ACEI group; D; TSA group

3 讨论

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia Miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎,主产于四川、山西、河北、江苏、安徽等省。丹参始载于《神农本草经》,被列为上品,中医理论认为丹参苦、微寒,入心、心包及肝经,具有活血通络、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦等功效。古有“一味丹参,功同四物”之说,丹参可用于月经不调、经闭痛经、瘀积聚、胸腹刺痛、热痹疼痛、疮疡肿痛、心烦不眠、肝脾肿大、心绞痛等。自 20 世纪 30 年代以来,众多的学者对丹参总酚酸的活性成分和药理作用进行了大量研究,并得到了许多化学成分,其药理学研究表明,丹参对心脑血管系统、消化系统、呼吸系统、中枢神经系统、免疫系统等均有保护作用^[7]。丹酚酸 B 盐对肝脏纤维化有明显的抑制作用,已进入临床试验。本研究的目的是观察丹参总酚酸对肾纤维化的抑制作用,以本实验的结果可以看出,其对肾纤维化也有同样的抑制作用,相关结果已申报了发明专利。

肾小球硬化和肾间质纤维化是多种临床和实验性肾病进展的共同转归,是肾功能衰竭的主要病理基础。许多证据也显示 TGF- β_1 是肾脏纤维化发生、发展中的必需因子。UUO 模型是研究肾间质纤维化的较理想模型。UUO 模型致肾间质纤维化的机制可能主要通过以下途径,即输尿管梗阻引起肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活,然后导致单核/巨噬细胞浸润,活化的单核/巨噬细胞分泌(包括 TGF- β_1 内的)多种炎性介质。TGF- β_1 是目前已知作用最强的致纤维化细胞因子之一, TGF- β_1 过度表达可导致肾小球硬化及肾间质纤维化。本实验观察到, UUO 后第 7 天 H-E 染色和 Masson 染色可见间质中多量炎性细胞浸润和纤维化,同时在对 TGF- β_1 的免疫组化的检测中也发现了其大量的表达^[8]。因此, TGF- β_1 信号转导级联就成了研究各种原因所致肾脏病变的潜在靶点^[9]。

本实验就利用 UUO 建立的大鼠肾纤维化模型来研究丹参总酚酸对缓解纤维化的作用。大鼠服用了丹参总酚酸提取物之后,通过 H-E 染色和 Mas-

son 对肾组织染色,可以看出其延缓了肾组织的纤维化,其效果和 ACEI 的效果差不多;同时通过对 TGF-β₁ 进行免疫组化检测,可以看出丹参总酚酸也大大抑制了 TGF-β₁ 的产生,这也和 ACEI 相类似。而且丹参总酚酸是中成药物,其不良反应较少并且来源较广,有希望开发成为治疗肾纤维化的药物。

[参考文献]

[1] 张军,陶立坚.肾脏纤维化的研究进展[J].国外医学:生理、病理科学与临床分册,2000,22:593-595.

[2] 杨朝晖,甘华.转化生长因子-β与器官纤维化[J].中国全科医学,2004,14:1102-1105.

[3] 朱海慧,李静,马居里.肾纤维化的中医药防治进展[J].陕西中医学院学报,2003,26:53-56.

[4] 唐忠志,郑智,唐瑛,等.丹参对自发性高血压大鼠心肌纤维化的逆转作用及其机制研究[J].华中科技大学学报(医学版),2002,31:292-294.

[5] 林琼真,于洁,邓英辉,等.丹参注射液对大鼠梗阻性肾间质纤维化的保护作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2003,4:71-73.

[6] 薛痕,樊均明,陈亮,等.大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究[J].四川动物杂志,2004,23:16-20.

[7] 柳丽,张洪泉.丹参活性成分的现代中药药理研究进展[J].中国野生植物资源,2003,22:1-4.

[8] 祝高红,朱忠华,张春.肝细胞生长因子在大鼠肾间质纤维化中作用机制的研究[J].医学研究生学报,2004,17:319-321.

[9] 王琳,邓跃毅,陈以平.Sm^{ad}7对TGF-β/Sm^{ad}信号转导通路的调节及其在肾纤维化中的作用[J].第二军医大学学报,2004,25:207-209.

[收稿日期] 2006-05-14 [修回日期] 2006-09-14

[本文编辑] 尹茶

· 读者 作者 编者 ·

GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》规定的文献著录格式(II)

专著中的析出文献

著录格式:

[序号] 析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志].析出文献其他责任者//专著主要责任者.专著题名:其他题名信息.版本项.出版地:出版者,出版年:析出文献的页码[引用日期].获取和访问路径.

示例:

[1] 白书农.植物开花研究[M]//李承森.植物科学进展.北京:高等教育出版社,1998:146-163.

[2] 程根伟.1998年长江洪水的成因与减灾对策[M]//许厚泽,赵其国.长江流域洪涝灾害与科技对策.北京:科学出版社,1999:32-36.

[3] 钟文发.非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵玮.运筹学的理论与应用:中国运筹学会第五届大会论文集.西安:西安电子科技大学出版社,1996:468-471.

[4] WEINSTEIN L,SWERTZ MN.Pathogenic properties of invading microorganism[M]//SODEMAN WA,Jr.,SODEMAN WA.Pathologic physiology:mechanisms of disease.Philadelphia:Saunders,1974:745-772.

连续出版物

著录格式:

[序号] 主要责任者.题名:其他题名信息[文献类型标志].年,卷(期)-年,卷(期).出版地:出版者,出版年[引用日期].获取和访问路径.

示例:

[1] 中国地质学会.地质评论[J].1936,1(1).北京:地质出版社,1936.

[2] 中国图书馆学会.图书馆学通讯[J].1957(1)-1990(4).北京:北京图书馆,1957-1990.

[3] American Association for the Advancement of Science.Science[J].1883,1(1)-.Washington,D.C.:American Association for the Advancement of Science,1883-.