

丹参多酚酸盐对肾间质纤维化模型大鼠的改善作用及机制研究[△]

魏丹丹^{1*}, 张超¹, 朱星昊¹, 梁磊¹, 李闪闪¹, 刘湘花¹, 李真珍², 蒋士卿^{1#} (1.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; 2.郑州大学第一附属医院医学研究中心, 郑州 450052)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)08-0915-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.08.04

摘要 目的:研究丹参多酚酸盐对肾间质纤维化(RIF)模型大鼠的改善作用及可能机制。方法:将50只雄性SD大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、氯沙坦组(阳性对照组,9 mg/kg)和丹参多酚酸盐低、高剂量组(18、36 mg/kg),每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均灌胃腺嘌呤250 mg/kg建立RIF模型。造模结束后,各给药组大鼠灌胃相应药物,正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,灌胃体积均为10 mL/kg,每天1次,连续30天。末次给药后,采用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)和尿液中24 h尿蛋白(24 h UPro)水平;采用苏木精-伊红染色法和Masson染色法分别观察大鼠肾组织病理学特点和纤维化情况,对肾小管损伤、肾小球硬化程度进行评分并计算肾组织阳性染色面积百分比;采用免疫组化法和Western blot法分别测定大鼠肾组织中Wnt蛋白(Wnt5a、Wnt5b)、 β -联蛋白(β -catenin)的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠Scr、BUN、24 h UPro水平和肾小管损伤评分、肾小球硬化评分、肾组织阳性染色面积百分比以及Wnt5a、 β -catenin蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$),Wnt5b蛋白的表达水平显著降低($P < 0.05$);显微镜下可见大鼠肾组织出现系膜增生、纤维组织增多、炎性细胞浸润等病理学变化。与模型组比较,氯沙坦组和丹参多酚酸盐低、高剂量组大鼠的上述指标均显著改善($P < 0.05$),且丹参多酚酸盐的作用具有一定的剂量依赖性趋势。结论:丹参多酚酸盐对腺嘌呤致RIF模型大鼠具有改善作用,其机制可能与抑制Wnt/ β -catenin信号通路有关。

关键词 丹参多酚酸盐;腺嘌呤;肾间质纤维化;肾功能;Wnt蛋白/ β -联蛋白信号通路;大鼠

Study on Improvement Effect of Salvianolate on Renal Interstitial Fibrosis Model Rats and Its Mechanism

WEI Dandan¹, ZHANG Chao¹, ZHU Xinghao¹, LIANG Lei¹, LI Shanshan¹, LIU Xianghua¹, LI Zhenzhen², JIANG Shiqing¹ (1. First Clinical College, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; 2. Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect of salvianolate on renal interstitial fibrosis (RIF) model rats and its possible mechanism. METHODS: Totally 50 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, losartan group (positive control group, 9 mg/kg) and salvianolate low-dose and high-dose groups (18, 36 mg/kg) according to body weight, with 10 rats in each group. Except for normal group, other groups were given adenine 250 mg/kg intragastrically to establish RIF model. After modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically, and normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, the volume was 10 mL/kg, once a day, for consecutive 30 days. After last medication, the serum levels of creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN) and 24 h proteinuria (24 h UPro) were detected by ELISA. HE staining and Masson staining were used to observe the histopathological characteristics and fibrosis of the kidney. The degree of renal tubular injury and glomerulosclerosis were scored, and the percentage of positive staining area of renal tissue was calculated; immunohistochemistry and Western blot assay were used to determine the protein expression of Wnt5a, Wnt5b, and β -catenin. RESULTS: Compared with normal group, Scr, BUN and 24 h UPro levels, renal tubular injury score, glomerulosclerosis score, the percentage of positive staining area in renal tissue, the protein expression of Wnt5a and β -catenin were increased significantly in model group ($P < 0.05$), while the expression of Wnt5b protein was decreased significantly ($P < 0.05$). Pathological changes such as mesangial hyperplasia, fibrous tissue increase and inflammatory cell infiltration were observed under microscope. Compared with model group, above indexes of rats were improved significantly in losartan group, salvianolate low-dose and high-dose groups ($P < 0.05$), and the effect of salvianolate had dose-dependent trend. CONCLUSIONS: Salvianolate has the improvement effect on RIF model rats induced by adenine, and its mechanism may be related to inhibition of Wnt/ β -catenin signal pathway.

KEYWORDS Salvianolate; Adenine; Renal interstitial fibrosis; Renal function; Wnt/ β -catenin signal pathway; Rat

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1304803);河南中医药大学科研苗圃工程项目(No.MP2020-01)

* 博士研究生。研究方向:中医内科及肿瘤相关疾病的科研和临床。E-mail:1617924593@qq.com

通信作者:主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中医内科及肿瘤相关疾病的科研和临床。E-mail:jiangshiqing66@126.com

肾间质纤维化(RIF)是各种病理因素引发的慢性肾病发展至终末期肾衰竭的主要病理特征,主要包括肾血管纤维化、肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[1-2]。RIF发生的主要环节包括炎性细胞浸润、致纤维化因子激活、肾小管上皮细胞-肾间质肌成纤维细胞分化以及细胞外

基质过度沉积等^[3]。目前研究认为,纤维化期是肾病治疗的关键时期,若患者在此时期能得到及时、有效的治疗,便能有效缓解其疾病进展,从而提高患者生活质量^[4]。

中医学认为,RIF的主要病机为肾脉瘀阻,其中瘀血是主要的致病因素^[5]。因此,可采用祛瘀通肾法进行治疗,发挥活血祛瘀、恢复肾气、改善肾脏缺血状态、调节微循环和肾血流动力学异常状态等作用,以减缓RIF的发展。丹参多酚酸盐为活血化瘀中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.的主要活性成分,目前主要用于心脑血管疾病的治疗,其具有较好的抗氧化、促进血管新生等作用^[6]。Wnt蛋白/ β -联蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路是目前研究肾脏固有细胞转化成肌成纤维细胞(即上皮间质转化调控机制)的主要通路之一,故可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路活化来延缓肾纤维化进程^[7-9]。鉴于此,本研究基于中医祛瘀通络的治疗理念,选用活血化瘀类常用中药丹参的活性成分丹参多酚酸盐对RIF模型大鼠进行干预,观察其对大鼠肾脏功能及纤维化的影响,并通过考察Wnt/ β -catenin通路相关蛋白的表达情况来探讨丹参多酚酸盐对RIF模型大鼠的改善作用及可能机制,旨在为丹参多酚酸盐的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

MR-96TB型酶标仪购自骋克仪器(上海)有限公司;YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机均购自金华市科迪仪器设备有限公司;RM2235型石蜡切片机购自德国Leica公司;D3024R型台式高速冷冻微量离心机购自大龙兴创实验仪器(北京)有限公司;DN260型灭菌锅购自浙江新丰医疗器械有限公司;HWS-24型水浴锅购自上海齐欣科学仪器有限公司;SG-300型显微镜购自苏州神鹰光学有限公司;ChemiScope 6200 Touch型化学发光成像仪购自上海勒翔科学仪器有限公司。

1.2 主要药品与试剂

注射用丹参多酚酸盐[批号18120224,规格每瓶装50 mg(含丹参乙酸镁40 mg)]购自上海绿谷制药有限公司;氯沙坦钾片(批号429001,规格50 mg)购自重庆科瑞制药(集团)有限公司;腺嘌呤(批号S18009)、Masson染色试剂盒(批号G1340)均购自北京索莱宝科技有限公司;血尿素氮(BUN)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号C011-1-1)、血肌酐(Scr)ELISA试剂盒(批号C013-1-1)、24 h尿蛋白(24 h UPro)ELISA试剂盒(批号C035-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;兔SP试剂盒(批号SP-9001)、DAB显色试剂盒(批号ZLI-9017)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;BCA蛋白定量检测试剂盒(批号C05-02001)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(批号C-0047)、兔

抗大鼠Wnt5a单克隆抗体(批号bs-1948R)、兔抗大鼠Wnt5b单克隆抗体(批号bs-8010R)、兔抗大鼠 β -catenin单克隆抗体(批号bs-1165R)均购自北京博奥森生物技术有限公司;兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号GB12001)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号GB23303)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

健康SPF级SD大鼠50只,雄性,体质量150~200 g,购自河南省实验动物中心,生产许可证号为SCXK-(豫)2015-0004。动物购买后按啮齿类动物一级环境条件饲养于河南中医药大学实验动物基地,实验过程依照河南中医药大学动物伦理委员会和国家实验动物管理的相关规定进行。所有大鼠均以普通饲料适应性饲养14天后开始实验。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将50只大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、氯沙坦组(阳性对照,9 mg/kg,成人临床用量的等效剂量)和丹参多酚酸盐低、高剂量组(18、36 mg/kg,分别为成人临床用量的等效剂量和2倍等效剂量),每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均按250 mg/kg灌胃2.5%的腺嘌呤生理盐水混悬液以复制RIF模型:先每天灌胃1次,连续12天;然后改为隔天灌胃1次,连续12天,共24天^[10];正常组大鼠在造模期间同步灌胃等体积生理盐水。造模结束后,各给药组大鼠灌胃相应药物(以生理盐水溶解),正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水;灌胃体积均为10 mL/kg,每天1次,连续30天。

2.2 大鼠标本采集及处理

末次给药后,收集各组大鼠24 h尿液。然后腹腔注射氨基甲酸乙酯麻醉。于腹主动脉取血,血样以3 000 r/min离心10 min,取上层血清。然后将大鼠处死,解剖取其肾组织,以生理盐水冲洗后,一部分保存于4%多聚甲醛溶液中用于制作病理切片;另一部分保存于冻存管中,经液氮速冻后放入-80℃冰箱中冻存,用于Western blot实验。

2.3 大鼠血清中Scr、BUN水平和尿液中24 h UPro水平检测

采用ELISA法以酶标仪检测血清中Scr、BUN水平和尿液中24 h UPro水平,具体操作严格按照相应试剂盒说明书方法进行。

2.4 大鼠肾脏病理组织学观察

2.4.1 苏木精-伊红染色 取4%多聚甲醛溶液固定的肾组织适量,经脱水、透明、包埋后切片(厚度约4 μ m),进行常规苏木精-伊红(HE)染色,然后在显微镜下进行观察。每张切片随机选出5个不重叠的肾皮质区,根据

染色程度对肾小管损伤和肾小球硬化情况分别进行评分:正常,记为0分;轻度染色(染色面积≤25%),记为1分;中度染色(染色面积>25%~50%),记为2分;重度染色(染色面积>50%~75%),记为3分;极重度染色(染色面积>75%),记为4分^[1]。取平均值作为评价结果。

2.4.2 Masson 染色 另取上述石蜡切片经二甲苯脱蜡后,按Masson试剂盒说明书方法进行染色,其中肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色。采用Image J v1.8.0软件测定每个视野中蓝色阳性染色面积占总面积的百分比(简称“阳性染色面积百分比”),以此评价肾小管萎缩及肾间质纤维化水平^[1]。

2.5 大鼠肾组织中Wnt5a、Wnt5b、β-catenin蛋白表达水平检测

2.5.1 免疫组化法 取石蜡切片经脱蜡、水化后,H₂O₂封闭,然后以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,以柠檬酸盐缓冲液于121℃下热修复,再滴加山羊血清封闭液,室温孵育1h后倾去液体,分别滴加Wnt5a、Wnt5b、β-catenin一抗(稀释比例均为1:100),4℃孵育过夜;滴加HRP标记的羊抗兔IgG二抗(稀释比例均为1:100),37℃孵育20min。DAB显色,水冲洗,苏木精复染1~2min;1%盐酸乙醇溶液分化,水再次冲洗;然后经常规脱水、透明、封片后置于显微镜下检示(目标蛋白会被染成棕黄色),每组选取3张切片,采用Image-Pro Plus 6.0软件测定每个视野中细胞的积分光密度(IOD)值,取平均值作为检测结果。

2.5.2 Western blot 法 取肾组织,用冷PBS洗去血污后剪成小块置于匀浆管中,加入10倍体积的RIPA裂解液彻底匀浆,冰浴30min后,以12 000 r/min离心10min,收集上清,即为总蛋白溶液。用BCA蛋白浓度测定试剂盒定量分析后,加入上样缓冲液,沸水浴15min使蛋白变性。取变性后蛋白适量,进行SDS-PAGE(浓缩胶电压75V,分离胶电压120V),然后以300mA恒流电转30min至聚偏二氟乙烯膜上;5%脱脂牛奶室温封闭1h后,加入Wnt5a、Wnt5b、β-catenin、β-actin一抗(稀释比例均为1:3 000),4℃孵育过夜;TBST漂洗5min×3次,加入HRP标记的羊抗兔IgG二抗(稀释比例均为1:3 000),室温孵育30min;TBST漂洗5min×3次,使用ECL试剂盒显色,于化学发光成像仪上成像,然后采用Image J v1.8.0软件测定条带灰度值,以目标蛋白条带与内参蛋白(β-actin)条带的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;方差齐者组间两两比较采用LSD检验,方差不齐者组间两两比较采用Dennett's检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 丹参多酚酸盐对RIF模型大鼠血清中Scr、BUN水平和尿液中24h UPro水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中Scr、BUN水平和尿液中24h UPro水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中Scr、BUN水平和尿液中24h UPro水平均显著降低($P < 0.05$),而各给药组血清中上述指标水平组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中Scr、BUN水平和尿液中24h UPro水平检测结果见表1。

表1 各组大鼠血清中Scr、BUN水平和尿液中24h UPro水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Serum levels of Scr and BUN and urine level of 24 h UPro of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	Scr, μmol/L	BUN,mmol/L	24 h UPro,mg/L
正常组		135.00±15.00	5.44±0.30	4.56±0.19
模型组		243.60±11.63*	7.78±0.61*	6.26±0.24*
氯沙坦组	9	136.80±12.51#	5.64±0.65#	5.22±0.31#
丹参多酚酸盐低剂量组	18	143.40±14.21#	5.72±0.91#	4.68±0.30#
丹参多酚酸盐高剂量组	36	138.80±14.96#	5.50±0.74#	4.86±0.22#

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

3.2 丹参多酚酸盐对RIF模型大鼠肾脏病理组织学的影响

3.2.1 HE 染色结果 病理取材时可见模型组大鼠肾脏代偿性增大,表面存在凸起。HE染色结果显示:正常组大鼠肾小管结构排列整齐,肾小球形态规则,无系膜增生,间质正常,未见炎性细胞浸润;模型组大鼠可见系膜增生,肾小管扩张或萎缩,肾小球硬化且形态不规则,球囊粘连,纤维化组织增多,间质增宽,可见炎性细胞浸润;丹参多酚酸盐低、高剂量组和氯沙坦组大鼠肾小管扩张或萎缩减轻,炎性细胞减少。与正常组比较,模型组大鼠肾小管损伤评分、肾小球硬化评分均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠肾小管损伤评分、肾小球硬化评分均显著下降($P < 0.05$),而各给药组上述指标评分组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠肾组织HE染色显微图见图1,肾小管损伤评分、肾小球硬化评分结果见表2。

3.2.2 Masson 染色结果 正常组大鼠肾间质可见少量纤维化;模型组大鼠肾间质纤维化程度明显增加;氯沙坦组和丹参多酚酸盐低、高剂量组大鼠肾间质纤维化程度均较模型组明显改善。与正常组比较,模型组大鼠肾组织阳性染色面积百分比显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠肾组织阳性染色面积百分比均显著降低($P < 0.05$)。与氯沙坦组比较,丹参多酚酸盐低剂量组大鼠肾组织阳性染色面积百分比差异无统计学意义($P > 0.05$),但丹参多酚酸盐高剂量组大鼠肾组织阳性染色面积百分比显著降低($P < 0.05$)。与丹参多酚酸盐低剂量组比较,丹参多酚酸盐高剂量组大鼠肾组织

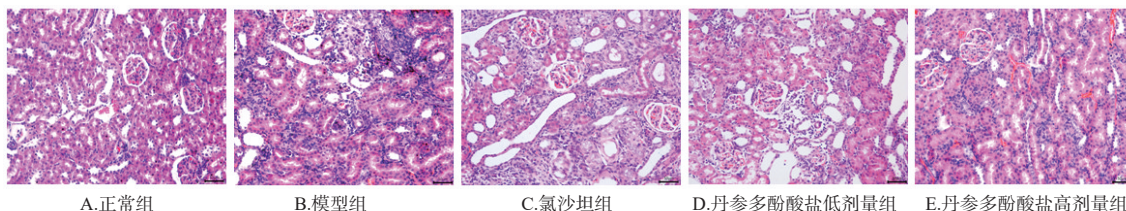


图1 各组大鼠肾组织HE染色显微图($\times 200$)

Fig 1 HE staining micrographs of renal tissue of rats in each group($\times 200$)

阳性染色面积百分比显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠肾组织 Masson 染色显微图见图 2, 阳性染色面积百分比检测结果见表 2。

表 2 各组大鼠肾小管损伤评分、肾小球硬化评分和阳性染色面积百分比检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Renal tubular injury score, glomerulosclerosis score and the percentage of positive staining area of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	肾小球损伤评分, 分	肾小管硬化评分, 分	阳性染色面积百分比, %
正常组		1.25 ± 0.02	1.25 ± 0.04	11.78 ± 1.25
模型组		3.23 ± 0.02 [*]	3.23 ± 0.02 [*]	79.58 ± 2.57 [*]
氯沙坦组	9	1.53 ± 0.03 [†]	1.53 ± 0.03 [†]	71.69 ± 4.08 [†]
丹参多酚酸盐低剂量组	18	1.77 ± 0.02 [‡]	1.74 ± 0.03 [‡]	73.52 ± 2.73 [‡]
丹参多酚酸盐高剂量组	36	1.63 ± 0.02 [‡]	1.68 ± 0.03 [‡]	43.17 ± 0.47 ^{‡□}

注: 与正常组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [†] $P < 0.05$; 与氯沙坦组比较, [‡] $P < 0.05$; 与丹参多酚酸盐低剂量组比较, [□] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, [†] $P < 0.05$; vs. losartan group, [‡] $P < 0.05$; vs. salvianolate low-dose group, [□] $P < 0.05$

3.3 丹参多酚酸盐对 RIF 模型大鼠肾组织中 Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin 蛋白表达的影响

3.3.1 免疫组化检测结果 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中有大量 Wnt5a、 β -catenin 蛋白沉积, 其 IOD 值均显著升高($P < 0.05$); 有少量 Wnt5b 蛋白沉积, 其 IOD 值显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织中 Wnt5a、 β -catenin 蛋白沉积减少, 其 IOD 值均显著降低($P < 0.05$); Wnt5b 蛋白沉积增多, 其 IOD 值均显著升高($P < 0.05$)。与氯沙坦组比较, 丹参多酚酸盐低剂量组大鼠各蛋白沉积无明显变化, 其 IOD 值差异均无统计学意义($P > 0.05$); 但丹参多酚酸盐高剂量组大鼠肾组织中 Wnt5b 蛋白沉积减少, 其 IOD 值显著降低($P < 0.05$)。与丹参多酚酸盐低剂量组比较, 丹参多酚酸盐高剂量组大鼠肾组织中有少量 β -catenin 蛋白沉积, 其 IOD 值显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠肾组织中 Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin 蛋白表达的免疫组化染色图见图 3, IOD 值检测结果见表 3。

3.3.2 Western blot 检测结果 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$), Wnt5b 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织中 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$), Wnt5b 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与氯沙坦组比较, 丹参多酚

酸盐低剂量组大鼠肾组织中各蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$), 但丹参多酚酸盐高剂量组大鼠肾组织中 Wnt5a 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。与丹参多酚酸盐低剂量组比较, 丹参多酚酸盐高剂量组大鼠肾组织中 β -catenin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠肾组织中 Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin 蛋白表达的电泳图见图 4, 表达水平检测结果见表 4。

4 讨论

RIF 是慢性肾病的共同特征之一, 其主要特征是肌纤维母细胞浸润和细胞外基质的过度沉积, 常会导致肾功能丧失^[9]。腺嘌呤是嘌呤类含氮杂环化合物, 主要用于化疗药物引起的白细胞减少症的治疗^[10]。在黄嘌呤氧化酶作用下, 腺嘌呤可生成 2,8-二羟基腺嘌呤而使肾小管堵塞, 导致氮质化合物排出受到影响, 从而造成血清中 Scr、BUN 和尿酸水平升高。而血清中结晶的过饱和尿酸会在肾小管、间质及肾小球部位沉积形成异物, 使肾局部发生肉芽肿性炎症, 引起大量肾单位损伤, 最终引发 RIF^[11]。本研究采用腺嘌呤构建大鼠 RIF 模型, 发现模型大鼠血清中 Scr、BUN 及尿液中 24 h UPro 水平均显著升高, 肾纤维化组织增多、间质增宽, 表明造模成功。该模型由腺嘌呤化合物沉积于肾小管及间质引起, 与临床上肾后性梗阻形成的慢性肾衰类似^[12], 可以用于 RIF 的研究。

丹参是唇形科植物丹参的干燥根及根茎, 始载于《神农本草经》, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效^[13]。丹参多酚酸盐是由从丹参中提取的多酚酸盐类化合物, 可依靠多途径保护血管内皮细胞, 且具有抗纤维化作用^[14]。根据 RIF 中医病机, 并结合纤维化的临床及病理特点, 本课题组认为活血化瘀通络能改善肾纤维化状态, 故选用丹参多酚酸盐为治疗药物。氯沙坦钾片是血管紧张素 II 受体拮抗剂类降压药, 除能有效控制患者血压、减少心血管并发症外, 还能降低尿蛋白水平及保护肾脏, 且已有多篇肾纤维化研究文献选择其作为阳性对照药物^[15-16], 故本研究选用氯沙坦钾片为阳性药物。本研究结果显示, 丹参多酚酸盐能降低 RIF 模型大鼠血清中 Scr、BUN 水平及尿液中 24 h UPro 水平, 并使其肾脏纤维化组织和炎症细胞减少、肾小管扩张或萎缩减轻, 表明丹参多酚酸盐对 RIF 模型大鼠具有较好的改善作用, 且丹参多酚酸盐的作用具有一定的剂量依赖性趋势。

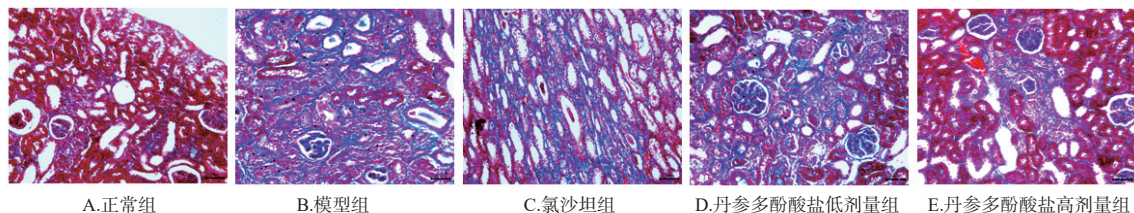


图2 各组大鼠肾组织Masson染色显微图($\times 200$)

Fig 2 Masson staining micrographs of renal tissue of rats in each group($\times 200$)

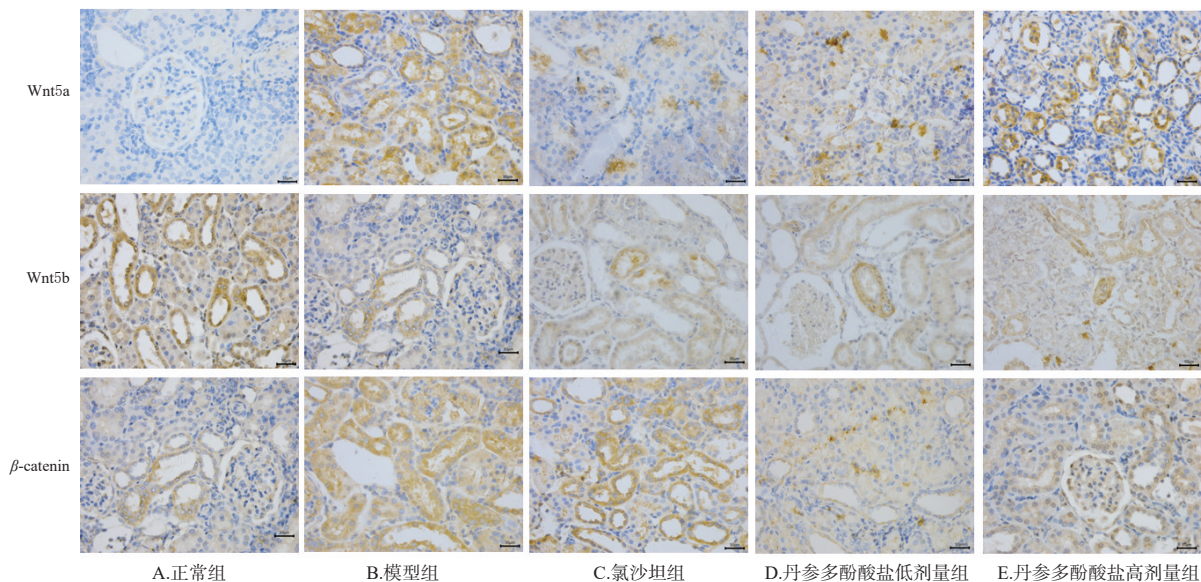


图3 各组大鼠肾组织中Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin蛋白的免疫组化染色图($\times 400$)

Fig 3 Immunohistochemistry staining diagrams of Wnt5a, Wnt5b and β -catenin proteins in renal tissue of rats in each group($\times 400$)

表3 各组大鼠肾脏组织Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin蛋白免疫组化IOD值检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 IOD value of Wnt5a, Wnt5b, β -catenin protein immunohistochemistry in renal tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	Wnt5a	Wnt5b	β -catenin
正常组		25.39 \pm 4.69	81.94 \pm 7.45	48.82 \pm 6.82
模型组		125.92 \pm 1.43*	40.73 \pm 9.38*	148.14 \pm 9.98*
氯沙坦组	9	39.44 \pm 4.08 [#]	83.25 \pm 14.98 [#]	43.30 \pm 6.69 [#]
丹参多酚酸盐低剂量组	18	32.87 \pm 9.68 [#]	83.96 \pm 16.56 [#]	50.87 \pm 6.09 [#]
丹参多酚酸盐高剂量组	36	31.57 \pm 12.28 [#]	82.70 \pm 11.36 ^{#Δ}	41.76 \pm 2.60 ^{#\square}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与氯沙坦组比较, ^{Δ} $P<0.05$;与丹参多酚酸盐低剂量组比较, ^{\square} $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$; vs. losartan group, ^{Δ} $P<0.05$; vs. salvianolate low-dose group, ^{\square} $P<0.05$

Wnt/ β -catenin 信号通路因果蝇基因 *Wingless* 而得名,可以调控胚胎发育和细胞分化过程,是上皮间质转化调控机制的主要通路之一^[18-19]。Wnt/ β -catenin 信号通路在正常肾脏中处于沉默状态,而当该通路相关蛋白表达增多时,肾脏纤维化的发生发展进程就会相对较快^[9]。因此,可以通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化来延缓肾纤维化进程^[9]。Wnt 蛋白是由 *Wnt* 基因编码的一种分泌型糖蛋白,也是 Wnt/ β -catenin 信号途径的重

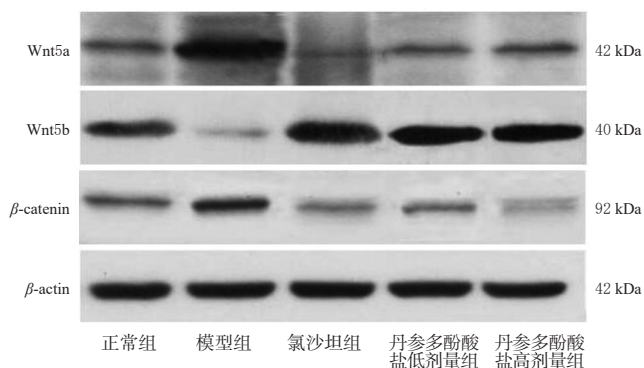


图4 各组大鼠肾组织中Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoretograms of Wnt5a, Wnt5b and β -catenin proteins in renal tissue of rats in each group

要因子,具有 Wnt5a、Wnt5b 等多个亚型^[17-18]。其中,Wnt5a 兼有诱导细胞分化成熟和异常激活 Wnt/ β -catenin 信号途径的功能,而 Wnt5b 则对 Wnt/ β -catenin 信号途径具有抑制作用^[19]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号途径的核心因子之一,其被活化后可在细胞中大量聚集,并与 DNA 亲和蛋白 LEF/TCF 结合,激活 *CyclinD1*、*C-myc* 等靶基因,从而启动细胞核中的细胞复制程序;此外,

表4 各组大鼠肾组织中Wnt5a、Wnt5b、 β -catenin蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Protein expressions of Wnt5a, Wnt5b, β -catenin in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	Wnt5a/ β -actin	Wnt5b/ β -actin	β -catenin/ β -actin
正常组		0.51±0.01	0.82±0.05	0.53±0.02
模型组		0.64±0.02 [*]	0.35±0.04 [*]	0.81±0.01 [*]
氯沙坦组	9	0.43±0.02 [#]	0.88±0.03 [#]	0.39±0.02 [#]
丹参多酚酸盐低剂量组	18	0.46±0.01 [#]	0.89±0.02 [#]	0.46±0.01 [#]
丹参多酚酸盐高剂量组	36	0.47±0.02 ^{#△}	0.83±0.02 [#]	0.27±0.02 [□]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与氯沙坦组比较,[△] $P<0.05$;与丹参多酚酸盐低剂量组比较,[□] $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$; vs. losartan group, [△] $P<0.05$; vs. salvianolate low-dose group, [□] $P<0.05$

β -catenin还可与E-钙黏蛋白结合形成复合体,从而促进细胞间黏附,当其表达缺失时,细胞间黏附作用将降低或丧失^[20-22]。本研究结果显示,RIF模型大鼠肾组织中Wnt5a、 β -catenin蛋白表达上调,Wnt5b蛋白表达下调;而丹参多酚酸盐可以显著下调RIF模型大鼠肾组织中Wnt5a、 β -catenin蛋白表达,上调Wnt5b蛋白表达,且其作用具有一定的剂量依赖性趋势。

综上所述,Wnt/ β -catenin信号途径在RIF模型大鼠肾组织中存在异常激活现象,而丹参多酚酸盐可以通过下调Wnt5a、 β -catenin蛋白的表达以及上调Wnt5b蛋白的表达来抑制该信号途径的异常激活,从而发挥对RIF模型大鼠的改善作用,且在本研究剂量范围内具有一定的剂量依赖性趋势。以上研究为丹参多酚酸盐在肾纤维化治疗方面的深入开发利用提供了实验依据,但其更多的作用机制仍需进一步探讨。

参考文献

[1] 吉晶,何立群.抗纤灵方对肾纤维化大鼠TGF- β /Smad信号通路表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):69-75.

[2] 马园园,刘成海,陶艳艳.肾纤维化动物模型特点与研究进展[J].中国实验动物学报,2018,26(3):398-403.

[3] 梁亮,崔长乐,何学红.参芪泄浊饮对腺嘌呤肾间质纤维化模型大鼠肾组织MMP-9、TIMP-1基因表达的影响[J].辽宁中医杂志,2015,42(1):190-193.

[4] SARA P, LAURA M A, CRISTINA A M, et al. Fibrosis in chronic kidney disease: pathogenesis and consequences[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1): 408.

[5] 史晓伟,张定华,罗向霞,等.补肾益气化浊通络法对糖尿病肾病小鼠肾脏细胞外基质的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):114-120.

[6] 王蓉,潘沛,王彧杰,等.丹参多酚酸盐对肝纤维化大鼠NF- κ B和I κ B α 表达的影响[J].中国新药与临床杂志,2011,30(1):51-55.

[7] 李强,曹陈军,陈奕,等.对丹参素药理作用的研究进

展[J].当代医学论丛,2019,17(10):16-18.

[8] HE X. Cilia put a brake on wnt signaling[J]. Nature Cell Biology, 2008, 10(1): 11-13.

[9] XIAO L, WANG M, YANG S, et al. A glimpse of the pathogenetic-mechanisms of Wnt/ β -catenin signaling in diabetic nephropathy[J]. Biomed Res Int 2013, 12(3): 987064.

[10] 马园园,刘成海,陶艳艳.肾纤维化动物模型特点与研究进展[J].中国实验动物学报,2018,26(3):398-403.

[11] 李秀花,赵丽君,李娜,等.腺嘌呤诱导幼鼠慢性肾功能衰竭模型建立的实验研究[J].山西医科大学学报,2016,47(11):978-981.

[12] ANTÓNIO N, MARIA J P, PAULA A O. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: a review of animal models and therapeutic strategies[J]. In Vivo, 2017, 31(1): 1-22.

[13] 孙星衍,孙冯翼.神农本草经[M].太原:山西科学技术出版社,2018:109-110.

[14] 李强,曹陈军,陈奕,等.对丹参素药理作用的研究进展[J].当代医学论丛,2019,17(10):16-18.

[15] 卢守燕,马志刚,黄军悦,等.氯沙坦钾下调尿酸性肾纤维化大鼠肾小管上皮细胞尿酸转运蛋白-1的表达[J].基础医学与临床,2019,39(5):720-725.

[16] 张文雷,王耀光.益气通络方改善单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化作用及其机制探讨[J].北京中医药,2020,39(9):916-921.

[17] 沈金峰,罗富里,胡芳,等.从“Wnt/ β -catenin-伏毒”论肾纤维化病因病机[J].中华中医药学刊,2019,37(1):70-72.

[18] ZHANG Z, CHENG L, LI J, et al. Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway overcomes resistance to enzalutamide in castration-resistant prostate cancer[J]. Cancer Res, 2018, 8(12): 3147-3162.

[19] 马云胜,唐煜,秦书俭. Wnt3a促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化[J].神经解剖学杂志,2010,26(3):299-302.

[20] 李俊国,寸向农,杨开明. Wnt3a、 β -catenin与CyclinD1在胃癌和胃溃疡组织中的表达及其临床意义[J].川北医学院学报,2012,27(3):201-205.

[21] MIAO J, LIU J, NIU J, et al. Wnt/ β -catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction[J]. Aging Cell, 2019, 18(5): e13004.

[22] YANG X Z, CHENG T T, HE Q J, et al. LINC01133 as ceRNA inhibits gastric cancer progression by sponging miR-106a-3p to regulate APC expression and the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 126.

(收稿日期:2020-12-02 修回日期:2021-02-23)

(编辑:林 静)