

global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(16): 5308-5319.

[17] Wang X, Chen Q, Pu H, *et al.* Adiponectin improves NF- κ B-mediated inflammation and abates atherosclerosis progression in

apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15: 33.

[18] Muller W A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 323-344.

保元排毒丸对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF- β 1、Smad3、Smad7 表达的影响

王身菊，张玲，朱美凤，唐丽君，郑宏香，陈岱*
(南京中医药大学附属常州市中医医院，江苏常州 213000)

摘要：目的 观察保元排毒丸对单侧输尿管梗阻（UUO）大鼠 TGF- β 1、Smad3、Smad7 表达的影响。**方法** 48 只大鼠随机分为假手术组，UUO 组，厄贝沙坦组，保元排毒丸低、中、高剂量组，每组 8 只。假手术组和 UUO 组大鼠灌胃生理盐水，其他组大鼠灌胃相应药物 14 d。末次灌胃 24 h 后，Masson 染色观察肾组织病理变化，Western blot、RT-PCR 分别检测 TGF- β 1、Smad3、Smad7 蛋白、mRNA 表达。**结果** 与 UUO 组比较，保元排毒丸各剂量组和厄贝沙坦组肾纤维化程度明显减轻（ $P < 0.01$ ），TGF- β 1、Smad3 表达明显降低（ $P < 0.05$ ），Smad7 表达明显升高（ $P < 0.05$ ）。**结论** 保元排毒丸可通过下调 TGF- β 1、Smad3 表达，上调 Smad7 表达来延缓 UUO 大鼠肾纤维化。

关键词：保元排毒丸；单侧输尿管梗阻（UUO）；TGF- β 1；Smad3；Smad7

中图分类号：R285.5 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2018)07-1463-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.003

Effects of Baoyuan Paidu Pills on the expressions of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 in rats with unilateral ureteral obstruction

WANG Shen-ju, ZHANG Ling, ZHU Mei-feng, TANG Li-jun, ZHENG Hong-xiang, CHEN Dai*
(Changzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Baoyuan Paidu Pills (BPP) on the expressions of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). **METHODS** Forty-eight rats were randomly divided into six groups, sham-operation group, UUO group, irbesatan group, high-dose BPP group, medium-dose BPP group, low-dose BPP group, with eight rats in each group. The rats in the sham-operation group and UUO group were intragastrically administrated with normal saline, which in the other groups were intragastrically administrated with corresponding drugs for fourteen days. The pathological changes of renal tissue were observed by Masson staining after 24 h of last intragastric administration. The protein and mRNA expressions of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 were detected by Western blot and RT-PCR, respectively. **RESULTS** The various BPP dose groups and irbesatan group displayed their superiority to the UUO group in terms of significantly reduced renal fibrosis degree（ $P < 0.01$ ）, significantly decreased expressions of TGF- β 1 and Smad3（ $P < 0.05$ ）, and significantly

收稿日期：2018-01-15
基金项目：江苏省常州市科技局项目（CJ20160042）
作者简介：王身菊（1971—），女，博士，主任中医师，从事肾脏病的中西医结合治疗和研究工作。Tel: 13815025618, E-mail: shen-juwang@163.com
* 通信作者：陈岱（1962—），男，主任医师，从事肾脏病的临床治疗和研究工作。Tel: 13506110116, E-mail: czyysnked116@163.com

increased expression of Smad7 ($P < 0.01$). **CONCLUSION** BPP can postpone renal fibrosis in UUO rats by down-regulating the expressions of TGF- β 1, Smad3, and up-regulating the expression of Smad7.

KEY WORDS: Baoyuan Paidu Pills; unilateral ureteral obstruction (UUO); TGF- β 1; Smad3; Smad7

肾间质纤维化是指各种慢性肾脏病,包括原发性肾小球疾病、继发性肾脏病、急慢性间质性肾炎等进展到终末期肾脏疾病的共同病理改变,其程度能判断肾功能受损害的情况,并决定慢性肾脏病的预后^[1],故如何延缓和防治肾纤维化是防治慢性肾脏病的关键。

课题组前期发现,保元排毒丸有缓解慢性肾衰竭患者临床症状、降低尿毒症毒素、延缓肾衰竭进展、保护维持性血液透析患者残余肾功能的作用^[2-5]。为了进一步探讨保元排毒丸抗肾纤维化的机理,本实验考察了其对于单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠 TGF- β 1、Smad3、Smad7 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 48 只,7~8 周,体质量(190 ± 8) g,购自南京医科大学实验动物中心,动物生产许可证号码 SCXK(苏)2016-0002。给予标准普通饲料喂养,自由饮水,日常光照,适应性饲养 3 d 后进入实验。

1.2 药物 保元排毒丸(批号 160902)来源于南京中医药大学附属常州市中医医院制剂室,由生黄芪、生晒参、黄精、冬虫夏草、丹参、接骨木、陈皮、生大黄、六月雪、木灵芝组成,剂型水泛蜜丸,每丸重 0.14 g,相当于生药量 0.38 g。厄贝沙坦(商品名安博维),由赛诺菲杭州制药有限公司生产,规格 150 mg/片。

1.3 试剂 苏木素-伊红染液、Masson 染色试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司);DAB 显色试剂盒(丹麦 Dako 公司);TRIS (Solarbio T8060)、Trizol Reagent、BCA 蛋白定量检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司);兔源性 TGF- β 1 抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab155264);兔源性 Smad3 抗体(宜百康生物科技有限公司,货号 1735-1);兔源性 Smad7 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 25840-1-AP)。引物设计合成(武汉擎科创新生物科技有限公司),包括 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo #K1622)、Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche 04 913 914 001)、Hy-Pure™Molecular Biology Grade Water (HyClone SH30538.02)。

1.4 仪器 JJ-12J 脱水机、JB-P5 包埋机(武汉俊杰电子有限公司);烤箱、RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);ECLIPSE Ci 正置光学显微镜(日本 Nikon 公司);752-P 紫外分光光度计(上海现科仪器有限公司);Neofuge 15R 冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司);DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂);AlphaEaseFC 灰度分析软件(美国 Alpha Innotech 公司);Stepone plus 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);多样品研磨珠均质仪(美国 Omni 公司)。

2 方法

2.1 分组及模型建立 48 只大鼠随机分为造模组(40 只)和假手术组(8 只),造模组按文献[6]方法,3%戊巴比妥钠以 0.2 mL/100 g 剂量腹腔注射麻醉,固定大鼠,剃去右背部毛发,暴露皮肤,聚维酮碘消毒皮肤 3 遍,铺无菌手术巾,在距脊柱约 1~1.5 cm、肋缘下作一长约 1~1.5 cm 的纵行切口,逐层剥离皮下筋膜,切开肌肉,暴露出肾盂及输尿管,玻璃分针分离出右输尿管,近肾盂处结扎输尿管两次,从两结扎中间剪断输尿管后逐层缝合,关闭腹腔,聚维酮碘消毒皮肤切口,用无菌敷料覆盖包扎;假手术组只分离右输尿管,不结扎,然后逐层缝合。造模后第 2 天,造模组随机分为 5 组,即 UUO 组,保元排毒丸低、中、高剂量组,厄贝沙坦组。

2.2 给药 将保元排毒丸溶于蒸馏水中,分别配成 25%、12.5%、6.25%,置于冰箱中冷藏备用。造模第 2 天开始灌胃给药,共 14 d,其中保元排毒丸低、中、高剂量组分别给予药物 1.25、2.5、5.0 g/(kg·d),厄贝沙坦组给予药物 12.5 mg/(kg·d);假手术组和 UUO 组给予等量生理盐水灌胃。

2.3 指标检测

2.3.1 肾组织病理 于末次灌胃禁食不禁水 24 h 后麻醉大鼠,取右肾,剔除包膜,无菌纱布吸干水分,电子天平称取湿重后,纵切一半置于 4% 多聚甲醛中固定;另一半分装于 EP 管中,于 -80℃ 下保存作进一步检测,固定 24 h 后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,切 4.0 μ m 薄片。按试剂盒方法进行 Masson 染色,显微镜下观察肾脏病理学改变,Masson 染色半定量统计肾间质纤维化情况。在光

学显微镜（200 倍）下连续观察每张切片不重叠的 10 个视野，计算出每个视野下肾间质苯胺蓝染色面积，取其平均值进行半定量分析。

2.3.2 TGF-β1、Smad3、Smad7 蛋白表达 取保存于 -80 ℃ 下的肾组织，冷 PBS 洗涤 2~3 次以去除血污，剪成小块置于匀浆器中，加入适量裂解液后冰上彻底匀浆，1 500 ×g 离心 10 min，收集上清，即为总蛋白溶液，BCA 法测定蛋白浓度。每个上样孔加 4 μg 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 胶电泳，湿转法电转移至 PVDF 膜，封闭液封闭 1~2 h 后各组加入适当稀释后的抗体（TGF-β1、Smad3、Smad7 均按 1：1 000 稀释），4 ℃ 下过夜，辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗用 TBST 稀释 3 000 倍，室温下孵育 30 min 后，TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次，每次 5 min，化学发光剂 ECL 反应 5 min，曝光，扫描蛋白条带，将胶片进行扫描存档，PhotoShop 整理去色，Alpha 软件处理系统进行分析，以各指标、内标吸光度的比值代表定量值。

2.3.3 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达 TGF-β1、Smad3、Smad7 的引物设计合成由武汉擎科创新生物科技有限公司完成，大鼠基因引物序列为 TGF-β1：正向 5'-GGCGGTGCTCGCTTTGTA-3'，反向 5'-TCCCGAATGTCTGACGTATTGA-3'，片段长度 201 bp；Smad3：正向 5'-CGAGAACACTAAGCTTCCCGCT-3'，反向 5'-GTGGTTCATCTGGTGGTCCGCTA-3'，片段长度 112 bp；Smad7：正向 5'-TCGGAAGTCAAGAGGCTGTGTT-3'，反向 5'-GTTTGAGAAAATCCATCGGGTA-3'，片段长度 148 bp；内参 GAPDH：正向 5'-TTCCTACCCCCAATGTATCCG-3'，反向 5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTT-3'，片段长度 281 bp。提取大鼠肾组织总 RNA、微量核酸分光光度计检测其水平和纯度，以 20 μL 为体系进行 cDNA 第一链的合成，以 25 μL 为反应体系进行 PCR 扩增，取 0.2 mL PCR 管，配制反应体系，每个反转录产物配制 3 管，组成为 2 × qPCR Mix12.5 μL、7.5 μmol/L 基因引物 2.0 μL、反转录产物 2.5 μL、ddH₂O 8.0 μL；PCR 扩增条件为预变性 95 ℃，10 min；循环（40 次）95 ℃，15 s→60 ℃，60 s；溶解曲线 75 ℃→95 ℃，每 20 s 升温 1 ℃。反应完成后，采用 2^{-△△Ct} 计算法进行数据统计分析。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行处理，计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间均数比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肾组织病理 如图 1、表 1 所示，假手术组肾小管间质、小球基底膜、系膜区无明显胶原沉积；UUO 组增宽的间质有较多蓝紫色条索状胶原沉积；保元排毒丸各剂量组和厄贝沙坦组蓝紫色胶原沉积明显少于 UUO 组（*P* < 0.01），这些组之间的纤维化程度无明显差别。

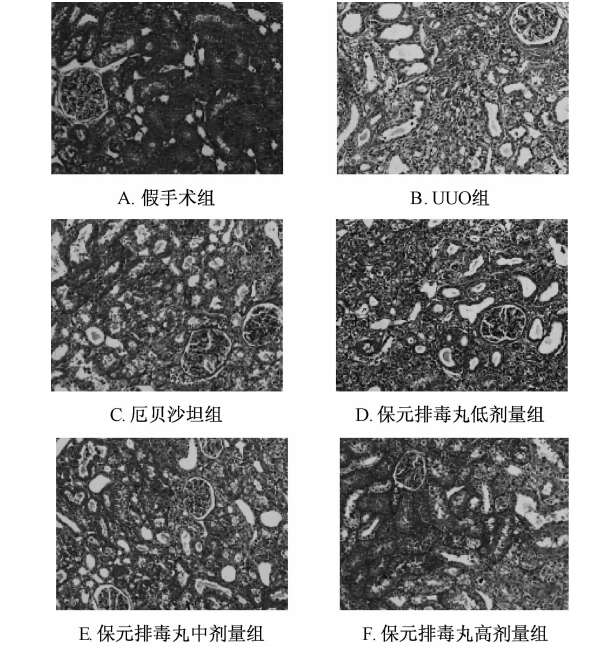


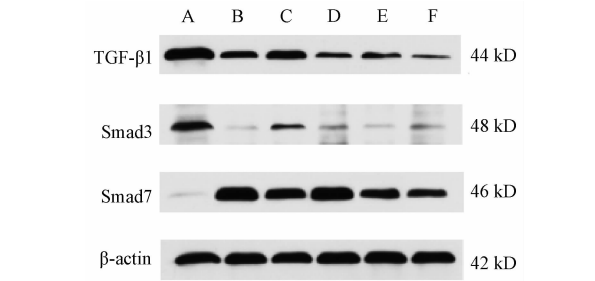
图 1 各组肾组织 Masson 染色 (×200)
Fig. 1 Masson staining of kidney tissues in various groups (×200)

表 1 各组 Masson 评分 ($\bar{x} \pm s$)		
Tab. 1 Masson scores in various groups ($\bar{x} \pm s$)		
组别	动物数/只	Masson 评分
UUO 组	8	2.20 ± 0.34 ♦♦
假手术组	8	0.31 ± 0.12 ##
厄贝沙坦组	8	0.93 ± 0.24 ##♦♦
保元排毒丸低剂量组	8	1.07 ± 0.24 ##♦♦
保元排毒丸中剂量组	8	0.95 ± 0.47 ##♦♦
保元排毒丸高剂量组	7	1.02 ± 0.21 ##♦♦

注：与 UUO 组比较，##*P* < 0.01；与假手术组比较，♦♦*P* < 0.01
保元排毒丸高剂量组大鼠在造模过程中因麻醉不当而死亡 1 只，下同

3.2 TGF-β1、Smad3、Smad7 蛋白表达 如图 2、表 2 所示，与假手术组比较，UUO 组 Smad7 表达明显减少（*P* < 0.01），TGF-β1、Smad3 表达明显升高（*P* < 0.01）；与 UUO 组比较，保元排毒丸各剂量组和厄贝沙坦组 Smad7 表达显著升高（*P* < 0.01）；TGFβ1、Smad3 表达显著减少（*P* < 0.01）。

3.3 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达 如表 3 所示，与假手术组比较，UUO 组 TGFβ1、Smad3



注：A~F 分别为 UUO 组，假手术组，厄贝沙坦组，保元排毒丸低、中、高剂量组

图 2 各组 TGF-β1、Smad3、Smad7 蛋白表达
Fig. 2 Protein expressions of TGF-β1, Smad3 and Smad7 in various groups

表 2 各组 TGFβ1、Smad3、Smad7 蛋白表达灰度值 (x̄±s)

Tab. 2 Gray values for protein expressions of TGF-β1, Smad3 and Smad7 in various groups (x̄±s)

组别	动物数/只	TGF-β1/β-actin	Smad3/β-actin	Smad7/β-actin
UUO 组	8	1.21 ± 0.08 ^{◆◆}	0.78 ± 0.05 ^{◆◆}	0.11 ± 0.06 ^{◆◆}
假手术组	8	0.41 ± 0.08 ^{##}	0.07 ± 0.01 ^{##}	1.03 ± 0.22 ^{##}
厄贝沙坦组	8	0.57 ± 0.05 ^{##◆}	0.30 ± 0.03 ^{##◆◆}	0.78 ± 0.14 ^{##}
保元排毒丸低剂量组	8	0.51 ± 0.11 ^{##◆}	0.15 ± 0.03 ^{##◆◆}	0.75 ± 0.15 ^{##}
保元排毒丸中剂量组	8	0.50 ± 0.08 ^{##◆}	0.19 ± 0.01 ^{##◆◆}	0.79 ± 0.09 ^{##}
保元排毒丸高剂量组	7	0.49 ± 0.09 ^{##◆}	0.21 ± 0.02 ^{##◆◆}	0.80 ± 0.11 ^{##}

注：与 UUO 组比较，^{##}*P* < 0.01；与假手术组比较，[◆]*P* < 0.05，^{◆◆}*P* < 0.01

表 3 各组 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达 (x̄±s)

Tab. 3 mRNA expressions of TGF-β1, Smad3 and Smad7 in various groups (x̄±s)

组别	动物数/只	TGF-β1	Smad3	Smad7
UUO 组	8	6.91 ± 3.13 ^{◆◆}	3.74 ± 1.06 ^{◆◆}	0.70 ± 0.29 ^{◆◆}
假手术组	8	1.01 ± 0.28 ^{##}	1.06 ± 0.51 ^{##}	2.08 ± 0.49 ^{##}
厄贝沙坦组	8	3.41 ± 1.19 ^{##◆◆}	2.64 ± 1.08 ^{◆◆}	2.29 ± 1.73 ^{##}
保元排毒丸低剂量组	8	4.77 ± 1.17 ^{◆◆}	2.43 ± 1.01 ^{◆◆}	1.61 ± 0.48 [◆]
保元排毒丸中剂量组	8	3.60 ± 2.13 ^{##◆◆}	2.78 ± 1.26 ^{◆◆}	2.32 ± 0.74 ^{##}
保元排毒丸高剂量组	7	2.35 ± 1.91 ^{##◆◆}	2.65 ± 0.62 ^{◆◆}	2.17 ± 1.05 ^{##}

注：与 UUO 组比较，[◆]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与假手术组比较，^{◆◆}*P* < 0.01

TGF-β 在肾脏疾病中起着非常重要的作用，包括肾纤维化、炎症、细胞增殖、细胞凋亡和变异^[7]，任何原因引起的肾纤维化均可使 TGF-β 表达显著上调^[7-8]。其中，TGF-β1 是公认的致肾纤维化因子，也是占比最高、活性最强的 TGF-β，主要存在于肾小管间质，能通过刺激肾小管上皮细胞转分化形成肌成纤维细胞^[9]，从而促纤维化发生；还能通过抑制细胞外基质金属蛋白酶的活性来抑制细胞外基质降解，导致其积聚而加重纤维化^[10]，这些过程主要是经激活 Smad 信号通路来完成的。研究表明^[11]，敲除 Smad3 可抑制梗阻性肾病及与药物毒性相关肾纤维化的发生，提示 Smad3 具有

mRNA 表达明显增强 (*P* < 0.01)，Smad7 表达明显减弱 (*P* < 0.01)；与 UUO 组比较，各给药组 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达显著减弱 (*P* < 0.05)，Smad7 表达显著增强 (*P* < 0.05)。

4 讨论

肾纤维化是各种慢性肾脏病的共同结局，而细胞因子是肾纤维化进展的关键因素，在炎症、缺氧、高糖等病因刺激下过度表达，并通过各种信号通路控制细胞核基因转录，导致肾纤维化。目前，肾纤维化信号通路主要涉及转化生长因子 β/Smad (TGF-β/Smad)、Wnt/β-catenin、丝裂原激活蛋白激酶级联等。

致病性；Schiffer 等^[12]用 Smad7 转基因的方法治疗肾纤维化模型，发现 TGF-β1 信号传递明显被阻断，表明 Smad7 上调可抑制肾纤维化的发展。Smad7 是一种抑制性 Smad，能使 TβRI 和 Smads 发生降解，从而对 TGF-β/Smad 信号通路起到负调控的作用^[13-14]，故对于 TGF-β/Smad 信号通路而言，上调 Smad7、下调 TGF-β1、Smad3 可减轻细胞外基质沉积，从而减轻肾纤维化。因此，本实验以 TGF-β1、Smad3、Smad7 为指标来探讨保元排毒丸抗肾纤维化的机理。

保元排毒丸为全国名老中医张志坚教授治疗慢性肾脏病的经验方。张老认为，慢性肾病的发生源

于虚、风、湿、瘀、毒，其中虚为慢性肾衰的因素，主要是肺、脾、肾的虚损，为慢性肾衰发生的内在基础；风为慢性肾衰发生的诱因，为外受或脏腑功能失调引动内风，风邪贯穿始终；湿、瘀为发病之主因，湿邪外受或脾虚生湿，湿蕴成浊、浊聚成毒，久病致瘀入络，风、湿、瘀、毒交阻，病情缠绵难愈，针对慢性肾衰共性核心病机“脾肾两虚、风湿瘀阻”，提出基本治法为益肾健脾、祛风清利、化瘀泄浊。保元排毒丸主要由生晒参、生黄芪、冬虫夏草、黄精、丹参、接骨木、生大黄、陈皮、六月雪、木灵芝组成，方中生晒参、生黄芪、黄精、冬虫夏草补肺脾肾，治病之本；丹参活血祛瘀；接骨木祛风利湿、六月雪清热利湿；生大黄苦寒泻下、荡涤肠胃、降泄浊邪，治病之标；木灵芝养心安神，陈皮健脾化湿，诸药相伍，补泻兼施，清消并用，标本同治，共奏益肾健脾、祛风清利、化瘀泄浊之功，治疗慢性肾病疗效可靠。

综上所述，保元排毒丸有延缓单侧输尿管梗阻（UUO）大鼠肾纤维化的作用，能下调 UUO 大鼠 TGF- β 1、Smad3 表达，上调 Smad7 表达。

参考文献：

[1] Liu Y H. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12): 684-696.
[2] 陈 岱, 王身菊, 张福产, 等. 保元排毒丸为主治疗糖尿病肾病临床观察[J]. *山东中医杂志*, 2004, 23(12): 731-732.
[3] 朱美凤, 陈 岱, 王身菊, 等. 中西医结合延缓 2~3 期慢性肾脏病进展的临床研究[J]. *江苏中医药*, 2011, 43(1): 27-28.

[4] 王身菊, 陈 岱, 张福产, 等. 保元排毒丸对维持性血液透析患者生活质量的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(1): 66-67.
[5] 王身菊, 朱美凤, 邓祥军, 等. 保元排毒丸对维持性血液透析患者残余肾功能的影响. [J] *中成药*, 2016, 38(1): 46-49.
[6] 张均田, 杜冠华. 现代药理试验方法（下册）[M]. 北京：中国协和医科大学出版社, 2012: 2007.
[7] Meng X M, Chung A C K, Lan H Y. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124(4): 243-254.
[8] Meng X M, Tang P M, Li J, *et al.* TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 82.
[9] Wei M G, Sun W, He W M, *et al.* Ferulic acid attenuates TGF- β 1-induced renal cellular fibrosis in NRK-52E cells by inhibiting Smad/ILK/Snail pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 619720.
[10] Du X Y, Shimizu A, Masuda Y, *et al.* Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of renal interstitial fibrosis in mouse obstructive nephropathy[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(8): 1149-1160.
[11] Sato M, Muragaki Y, Saika S, *et al.* Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(10): 1486-1494.
[12] Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, *et al.* Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling[J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 77: S45-S52.
[13] Lan H Y, Mu W, Tomita N, *et al.* Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound microbubble system in rat UUO model[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(6): 1535-1548.
[14] Lan H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.