

[药 理]

芪归益肾方对小鼠肾脏纤维化的延缓作用

尹归东^{1,2}, 席 一¹, 魏 祥¹, 魏明刚^{1*}
(1. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006; 2. 宁乡市中医医院, 湖南 长沙 410600)

摘要: **目的** 探讨芪归益肾方对小鼠肾脏纤维化的延缓作用。**方法** 建立单侧输尿管梗阻模型后, 40 只 ICR 小鼠随机分为假手术组、模型组、芪归益肾方组 (10 g/kg)、贝那普利组 (10 mg/kg)、川芎嗪组 (100 mg/kg)。HE、Masson 染色观察肾小管间质损伤情况; 免疫组化、蛋白质印迹检测 FN、TGF- β 1、PAI-1、TM 表达。**结果** 与模型组比较, 芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组明显改善肾小管间质纤维化, 抑制 FN、TGF- β 1、PAI-1 表达, 升高 TM 表达, 以芪归益肾方组更显著 ($P<0.05$)。**结论** 芪归益肾方可有效延缓单侧输尿管梗阻小鼠肾脏纤维化, 其作用机制可能与减少 PAI-1 表达, 增加 TM 表达或减少其代谢有关。

关键词: 芪归益肾方; 肾间质纤维化; TM; PAI-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)07-1515-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.008

Effects of Qigui Yishen Decoction on delaying renal fibrosis in mice

YIN Gui-dong^{1,2}, XI Yi¹, WEI Xiang¹, WEI Ming-gang^{1*}
(1. The First Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215006, China; 2. Ningxiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Changsha 410600, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Qigui Yishen Decoction on delaying renal fibrosis in mice. **METHODS** Unilateral ureteral obstruction model was established, after which forty ICR mice were randomly divided into sham-operation group, model group, Qigui Yishen Decoction group (10 g/kg), benazepril group (10 mg/kg) and ligustrazine group (100 mg/kg). Renal interstitial damage was observed by HE and Masson staining, the expressions of FN, TGF- β 1, PAI-1 and TM were detected by immunohistochemistry and Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, Qigui Yishen Decoction group, benazepril group and ligustrazine group demonstrated obviously improved renal interstitial fibrosis, inhibited expressions of FN, TGF- β 1, PAI-1, and increased expression of TM, especially for the Qigui Yishen Decoction group ($P<0.05$). **CONCLUSION** Qigui Yishen Decoction can effectively delay renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction, whose mechanisms may be related to reducing PAI-1 expression, and increasing TM expression or reducing its metabolism.

KEY WORDS: Qigui Yishen Decoction; renal interstitial fibrosis; TM; PAI-1

慢性肾脏病病因复杂, 病情易反复, 其不断进展的主要原因是肾组织内炎症因子与抗炎症相关因子之间的失衡, 导致组织内过度炎症反应及组织损伤, 从而引起纤维组织增生, 同时肾组织内固有细胞转分化, 如小管上皮细胞向成纤维细胞转化, 分泌过多的细胞外基质, 共同促成肾脏纤维化^[1]。因此, 如何减轻肾脏组织内炎症反应, 阻止肾脏纤维化发生, 往往是治疗慢性肾脏病的关键。

收稿日期: 2018-11-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473633, 81673896); 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研课题 (JDZX2015096); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX18_2526); 苏州市科技局应用基础研究项目 (SYS201602)

作者简介: 尹归东 (1977—), 男, 硕士生, 副主任中医师, 研究方向为中西医结合肾脏病基础与临床。Tel: 13815369929, E-mail: yinguidong168@sina.com

* 通信作者: 魏明刚 (1975—), 男, 博士, 主任中医师, 硕士生导师, 研究方向为中西医结合肾脏病基础与临床。Tel: 13812791993, E-mail: weiminggang@suda.edu.cn

近年来研究表明, 血液系统中某些凝血、纤溶相关物质与肾组织内炎症反应和纤维化有关, 如肾血管内皮细胞膜上的凝血酶调节蛋白(TM)和凝血酶结合可活化蛋白质C(PC), 活化的后者与内皮细胞蛋白质C受体(EPCR)结合而影响下游信号分子, 可减轻肾脏的炎症损伤^[2-3]。随着肾组织内炎症反应发生, 纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)在系膜细胞、内皮细胞、小管上皮细胞上表达增加^[4], 它可通过抑制基质金属蛋白酶2、纤溶酶活性来减少细胞外基质的降解, 从而引起肾组织中细胞外基质的沉积^[5-6]。

本课题组具有自主知识产权的方剂——芪归益肾方具有健脾益肾、活血通络的功效, 前期基础与临床研究中已证实它具有减轻蛋白尿、延缓肾脏纤维化的作用^[7-9]。中医“活血通络”与西医“凝血”“纤溶”有相通之处, 故推测芪归益肾方可能通过影响凝血、纤溶相关物质来发挥减轻肾组织内炎症反应、延缓肾脏纤维化的作用, 并通过本实验来验证这个观点。

1 材料

1.1 动物 雄性ICR小鼠40只, SPF级, 体质量(20±2)g, 由苏州大学医学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号SYXK(苏)2017-0043。

1.2 试剂 PAI-1抗体(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号DK8014); TGF-β1抗体(批号AH03071206)、山羊抗大鼠二抗(批号133974)[爱必信(上海)生物科技有限公司]; Thrombomodulin抗体(美国R&D公司, 批号cakk031805A); Fibronectin抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号153188); 山羊抗兔二抗(批号167976)、Tubulin抗体(批号166453)(杭州联科生物技术股份有限公司); 盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司, 批号x2615); 磷酸川芎嗪片(丽珠集团丽珠制药厂, 批号170901)。芪归益肾方药材(黄芪30g、太子参15g、芡实30g、金樱子30g、当归15g、牛膝15g、川芎15g、炒白术15g、白花蛇舌草30g、蝉蜕12g、甘草6g, 批号180218010)由苏州天灵药业有限公司提供, 经苏州大学附属第一医院药学部毛叶勤副主任中药师鉴定为正品, 均符合2015年版《中国药典》相关要求, 由苏州大学附属第一医院制剂室经煎煮、浓缩方法制备成混悬液, 生药量1g/mL。

1.3 仪器 电泳仪、电泳槽、转移槽、GelDoc XR⁺全自动凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);

SpectraMax 190光吸收酶标仪(美谷分子仪器有限公司); Axio Imager M1m显微镜(德国ZEISS公司)。

2 方法

2.1 造模^[10] 小鼠用2%戊巴比妥麻醉后, 进行左侧输尿管阻断术。小鼠固定于手术台, 腹部消毒, 沿腹正中线切开皮肤、肌层, 剪开腹膜, 暴露左侧肾脏、输尿管, 用5/0丝线结扎输尿管两道, 逐层缝合关腹, 假手术组仅开腹并游离左侧输尿管, 但不结扎输尿管, 其余步骤与手术组相同, 4℃生理盐水从左心室注入, 剪开右心耳流出血液, 灌洗体循环血液, 快速剖取左肾, 一部分以4%多聚甲醛溶液固定, 用于组织染色和免疫组织化学检测; 另一部分迅速置于液氮中, 储存于-80℃冰箱, 用于Western blot检测。

2.2 分组及给药 将40只小鼠适应性喂养1周, 自由饮水、进食, 随机分为芪归益肾方组(10g/kg)、贝那普利组(10mg/kg)、川芎嗪组(100mg/kg)、模型组(生理盐水10mL/kg)、假手术组(生理盐水10mL/kg)。造模成功2d后, 连续灌胃给药10d。

2.3 肾组织形态学观察 小鼠肾组织石蜡切片3μm, 进行HE、Masson染色, 光镜下观察, 以半定量方法评估肾小管间质纤维化程度。每个标本切片观察20个200倍不重叠视野, 以每个视野中肾小管扩张、炎症细胞浸润、肾小管萎缩和管型形成、间质细胞外基质沉积范围占总视野比例计算肾小管间质纤维化指数: 0分, 正常; 1分, <10%; 2分, 11%~25%; 3分, 26%~50%; 4分, 51%~75%; 5分, >75%。

2.4 免疫组化检测 小鼠肾组织石蜡切片, 常规脱蜡入水, 3% H₂O₂ 孵育10min, 消除内源性过氧化物酶活性后PBS洗涤3次, 微波抗原修复, 5%牛血清蛋白封闭20min, PBS洗涤3次, 加入一抗, 4℃下孵育过夜(Fibronectin一抗稀释比例为1:100, PAI-1为1:100, TGF-β1为1:400, Thrombomodulin为1:100), 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1h, PBS洗涤3次, DAB显色, 蒸馏水冲洗, 苏木素复染7min, 盐酸乙醇分化数秒使细胞核呈紫蓝色, 加氨水数秒至返蓝, 蒸馏水冲洗。然后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封片, 光镜下棕黄色颗粒区域为阳性表达, 每张切片随机寻找20个400倍不重叠视野, Image Pro Plus 6.0软件进行分析, 以阳性面积/视野总面积

表示蛋白表达量。

2.5 Western blot 检测 取-80℃下保存的小鼠肾组织，加入RIPA裂解液和苯甲基磺酰氟（PMSF）并进行组织研磨，提取组织总蛋白后测定其浓度。每孔加40 μg总蛋白上样，进行十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳，湿转法电转移至硝酸纤维素膜。加入含5%牛血清白蛋白（BSA）的TBST缓冲液，室温下封闭1 h，再加入一抗，4℃下孵育过夜（Fibronectin 一抗稀释比例为1：400，PAI-1为1：1 000，TGF-β1为1：1 000，Thrombomodulin为1：1 000，Tubulin为1：5 000），洗膜，加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1：2 000），室温下孵育1 h，洗膜，ECL试剂曝光显影。Image Pro Plus 6.0软件进行分析，通过目的蛋白与内标Tubulin的灰度比值计算目的蛋白相对表达量。

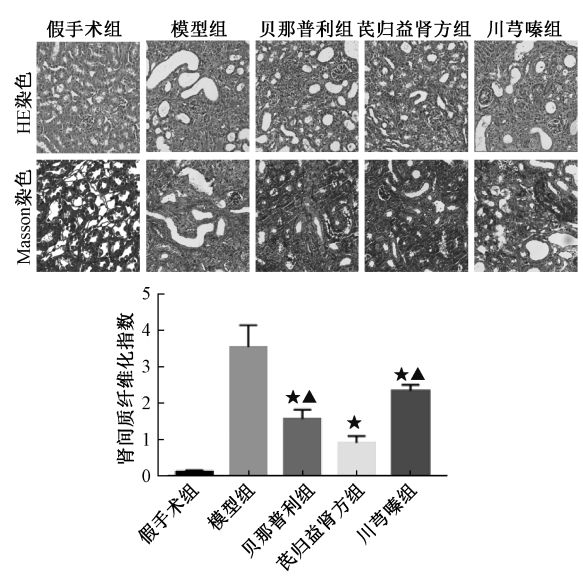
2.6 统计学分析 通过SPSS 17.0软件进行处理，符合正态分布的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠左侧肾脏外观 芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组、模型组小鼠左侧肾脏（结扎肾）体积相比假手术组（未结扎肾）明显增大，肾脏包膜紧张呈半透明状，可见黄色半透明的液体。梗阻侧肾脏纵向剖开后，可见血性或者乳白色积液流出，剖面观可见肾盂明显扩张，肾皮质明显变薄。

3.2 小鼠肾组织病理变化 HE染色显示，假手术组小鼠肾小球、肾小管及间质正常，芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组、模型组都有不同程度肾小管扩张、炎症细胞浸润、肾小管管型形成、间质细胞外基质沉积；Masson染色显示，小鼠肾脏胶原染色呈蓝色，假手术组无蓝色染色，芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组、模型组都有不同程度的蓝色染色，主要位于肾小囊、系膜区和肾小管的毛细血管周围及肾小管周围间质部分。模型组小鼠肾小管间质纤维化指数显著高于芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组（ $P<0.05$ ），而芪归益肾方组又显著低于贝那普利组、川芎嗪组（ $P<0.05$ ）。见图1。

3.3 免疫组化检测 与假手术组比较，芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组、模型组肾组织中TGF-β1、PAI-1、FN表达显著升高（ $P<0.05$ ），TM表达显著降低（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，芪



注：与模型组比较，* $P<0.05$ ；与芪归益肾方组比较，▲ $P<0.05$

图1 各组小鼠肾组织病理变化（×200）

Fig.1 Renal pathological changes of mice in various groups (×200)

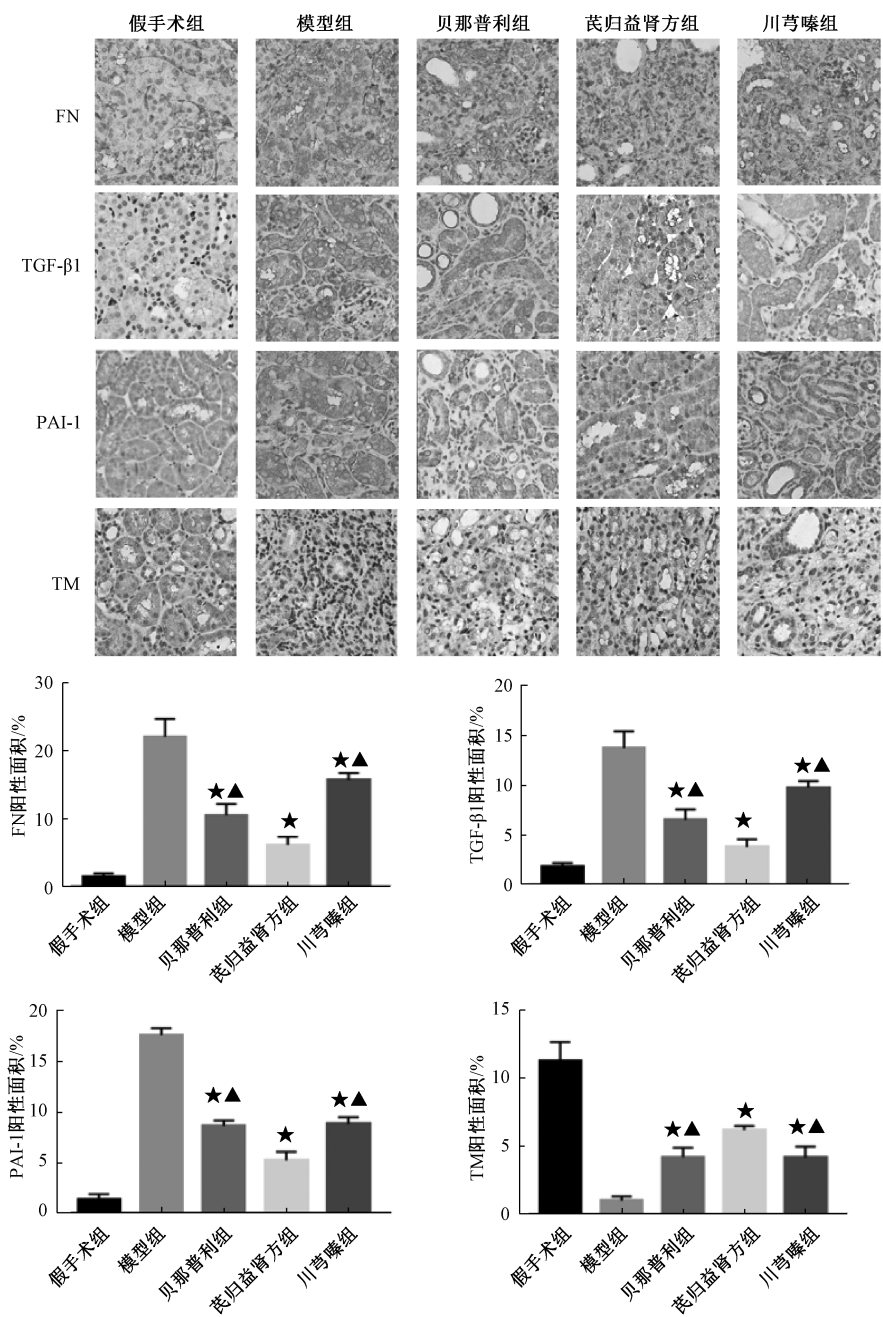
归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组前三者表达显著降低（ $P<0.05$ ），后者表达显著升高（ $P<0.05$ ），以芪归益肾方组更明显（ $P<0.05$ ）。见图2。

3.4 Western blot 检测 与假手术组比较，芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组、模型组肾组织中FN、TGF-β1、PAI-1表达显著增加（ $P<0.05$ ），TM表达显著降低（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组前三者表达显著降低（ $P<0.05$ ），后者表达显著升高（ $P<0.05$ ），以芪归益肾方组更明显（ $P<0.05$ ）。见图3。

4 讨论

在慢性肾脏病的发生发展过程中，血液高凝状态发挥了重要负面作用，这一点已形成共识^[11]。近年来还发现，一些凝血、纤溶相关物质通过激活信号通路来影响肾组织内炎症状态，并参与肾脏纤维化过程。

凝血酶调节蛋白（TM）主要存在于血管内皮表面，同时也存在于胸腔膜、心包膜、腹腔膜、蛛网膜等组织的间皮细胞表面，它是一种跨膜糖蛋白，由5个结构域组成，复杂结构使其具有多种生理功能。凝血酶能激活蛋白质C（PC），而TM能使激活速度增加1 000倍，活化的PC能灭活V因子和Ⅷ因子，减少肾血管内微血栓形成的风险，从而逆转凝血酶，还可与内皮细胞蛋白质C受体



注：与模型组比较，* $P<0.05$ ；与芪归益肾方组比较，▲ $P<0.05$

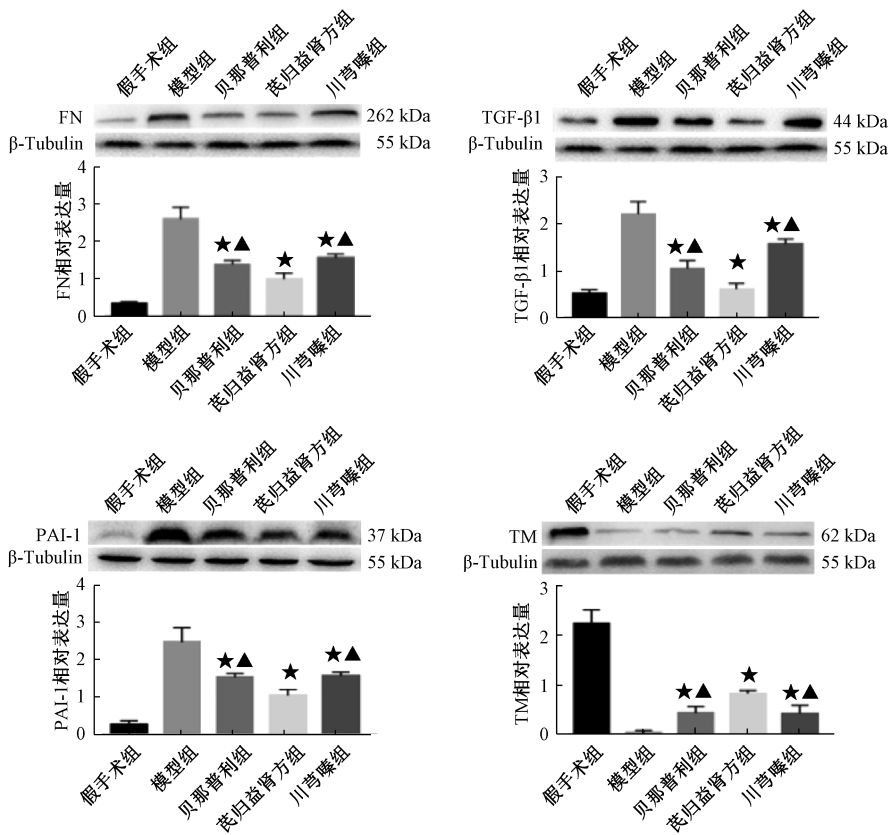
图 2 各组 FN、TGF-β1、PAI-1、TM 表达（免疫组化，×400）

Fig. 2 Expressions of FN, TGF-β1, PAI-1 and TM in various groups (immunohistochemistry, ×400)

(EPCR) 结合，通过影响下游信号分子来减轻肾脏炎症性损伤^[2-3]；也可激活蛋白酶激活受体 1 (PAR1) 而诱导下游信号通路，从而发挥促炎作用^[12]，并且调节蛋白和凝血酶结合时可阻止后者对 PAR1 的激活，发挥抗炎作用^[13]。

肾脏是一个容易受到缺血性损伤的器官，因为人在应急状态下为保障心、脑重要器官的血液供应而发生交感神经兴奋，对各器官血液供应重新调配，肾脏供血急剧减少，并且慢性肾脏病在损伤修

复的过程中，间质中胶原纤维沉积增加，毛细血管数减少，故对缺血性损伤非常敏感^[14]，而且组织内缺氧及高压、高灌注造成对内皮细胞的高切应力，均会造成内皮细胞损伤。受损的血管内皮细胞合成内皮素增加，而合成 NO 减少，这种缩血管物质与舒血管物质之间的失衡导致微血管过度收缩，又进一步加重缺血性损伤，当内皮细胞损伤时，TM 细胞外区域裂解为可溶性片段，Bao 等^[15]发现，在慢性肾脏病患者血浆中 TM 裂解产物浓度明



注：与模型组比较，* $P<0.05$ ；与芪归益肾方组比较，▲ $P<0.05$

图3 各组 FN、TGF-β1、PAI-1、TM 表达比较 (Western blot)

Fig. 3 Expressions of FN, TGF-β1, PAI-1 and TM in various groups (Western blot)

显升高，并且与病情严重程度呈正相关。川芎有效成分川芎嗪、黄芪有效成分黄芪黄酮和黄芪多糖、川芎和当归有效成分阿魏酸都已证实具有内皮细胞保护作用^[16-19]，本实验发现，芪归益肾方组肾组织中 TM 表达明显低于假手术组，可能是输尿管结扎造成梗阻后组织水肿造成肾内血管受压迫，引起缺血性损伤，肾组织内炎症反应加剧，造成血管内皮受损，TM 裂解增加；较贝那普利组、川芎嗪组更能明显增加 TM 在肾组织中表达，可能是该方能更好地保护内皮细胞，有利于增加 TM 表达或保护其免受裂解，从而减轻肾组织内炎症反应。

纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-1) 可与组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 和尿激酶纤溶酶原激活剂 (u-PA) 结合并使其灭活，tPA 主要由内皮细胞合成，而 u-PA 由内皮细胞、巨噬细胞、肾脏上皮细胞、某些肿瘤细胞合成，两者均可激活纤溶酶原，使其转变为纤溶酶，故 PAI-1 间接抑制了纤溶酶原激活，它主要由血管内皮细胞和肝细胞合成，血小板中也可合成，在正常的小鼠、大鼠、人肾脏组织中 PAI-1 表达很少，但随着炎症反应发

生，其在内皮细胞、系膜细胞、小管上皮细胞中表达增加^[4]。Oda 等通过 UUO 模型发现，PAI-1 基因敲除小鼠相比野生型小鼠肾间质纤维化明显减轻^[20]；Zhang 等^[21]报道，利用 PAI-1 突变体抑制内源性 PAI-1 活性有利于延缓糖尿病肾病发生，并有足细胞保护作用；杜义斌等^[22]利用 PAI-1 基因敲除小鼠发现，PAI-1 可通过抑制纤溶酶、基质金属蛋白酶 2 活性，减少细胞外基质的降解，从而引起小鼠肾脏中细胞外基质的沉积^[5]；Song 等^[23]通过动物实验证实，具有健脾益肾，活血泄浊功效的中药制剂可通过抑制 TGF-β1、PAI-1 表达，从而抑制细胞外基质过度积聚，减轻肾脏纤维化程度，其中前者是肾脏纤维化最核心的调节因子，可通过上调后者表达来促进细胞外基质聚积；本实验也证实，TGF-β、PAI-1 表达具有一致性，并且通过 Western blot、免疫组化检测发现，假手术组后者表达很少，而模型组、芪归益肾方组、贝那普利组、川芎嗪组都有不同程度升高，可能是输尿管结扎造成梗阻后，随着肾组织内炎症反应加剧前者表达增加，使得后者表达也增加，以芪归益肾方组更

明显。

中医认为，慢性肾脏病导致的肾脏纤维化属“肾络癥瘕”，其病机为本虚标实，因虚致实，即脾肾两虚，血脉瘀阻^[24]，治疗时健脾益肾固然是关键，但活血通络同样重要，国医大师张大宁提出补肾活血法则，在慢性肾小球肾炎、糖尿病肾病治疗中取得了良好疗效^[25-26]。芪归益肾方中金樱子、芡实益肾健脾，为君药；太子参、黄芪、白术益气健脾，为臣药；川芎、当归、牛膝活血通络，白花蛇舌草清利下焦，蝉蜕搜风通络，共为佐药；牛膝益肾通络又引药入肾经，甘草调和诸药，同为使药，全方共奏健脾益肾、活血通络的功效，针对慢性肾脏病的治疗既全面又有重点，具有良好的减轻蛋白尿、延缓肾脏纤维化作用。本实验发现，芪归益肾方可通过增加肾脏组织中 TM 表达或减少其代谢和减少 PAI-1 表达，从而起到减轻肾组织内的炎症反应和纤维化的作用，明确该方可通过影响凝血、纤溶相关因子起到保护肾脏的作用。

肾素-血管紧张素系统的激活在肾脏纤维化过程中发挥重要作用，如血管紧张素Ⅱ通过上调 NF- κ B、TGF- β 1、结缔组织生长因子（CTGF）表达，促进肾脏炎症和纤维化发生^[27-28]，同时血管紧张素转换酶抑制剂能明显减轻肾脏纤维化^[29]，本实验发现，芪归益肾方上述效果优于西药血管紧张素转换酶抑制剂——贝那普利。川芎嗪是从川芎中提取出的有效成分，具有降低血液黏度、改善微循环、抑制血小板聚集和血栓素 A2 合成的作用，并可抑制自由基产生，提高内源性抗氧化酶活性，还有抑制血管平滑肌细胞和成纤维细胞增生，抑制肾脏纤维化的作用^[30-32]，本研究发现，芪归益肾方上述效果优于川芎嗪。课题组前期基础研究中报道，芪归益肾方可通过对 TGF- β 1/Smads/PI3K 信号通路的影响来起到减轻肾脏纤维化的作用^[7]，这也证明中药方剂作为多物质组成的集团具有多靶点治疗作用，也是中医药治疗肾脏病的优势，对将来中药方剂的相关研究非常重要。

参考文献：

[1] Eddy A A. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis[J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2014, 4(1): 2-8.

[2] Dong W, Wang H, Shahzad K, *et al.* Activated protein C ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by restricting γ -box binding protein-1 ubiquitination[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(11): 2789-2799.

[3] Lattenist L, Jansen M P, Teske G, *et al.* Activated protein C protects against renal ischaemia/reperfusion injury, independent of its anticoagulant properties [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116(1): 124-133.

[4] Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(3): 503-510.

[5] Lee H B, Ha H. Plasminogen activator inhibitor-1 and diabetic nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2005, 10 (s2): S11-S13.

[6] Flevaris P, Vaughan D. The role of plasminogen activator inhibitor type-1 in fibrosis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2017, 43 (2): 169-177.

[7] 杨彦裕, 魏明刚, 刘蔚, 等. 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾组织 TGF- β 1/Smads/PI3K 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 89-93.

[8] 魏明刚, 杨彦裕, 陈琳, 等. 芪归益肾方延缓单侧输尿管梗阻小鼠肾脏纤维化进展机制的探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 90-95.

[9] 魏明刚, 何伟明, 李凤玲, 等. 芪归益肾方治疗慢性肾脏病脾肾两虚证的临床研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(6): 570-573.

[10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1860-1861.

[11] 王海燕. 肾脏病学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 772-784.

[12] Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation [J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34 (1): 63-72.

[13] Sharfuddin A A, Sandoval R M, Berg D T, *et al.* Soluble thrombomodulin protects ischemic kidneys [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(3): 524-534.

[14] Long D A, Norman J T, Fine L G. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8(4): 244-250.

[15] Bao Y S, Jia X B, Wang D, *et al.* Characterization of soluble thrombomodulin levels in patients with stage 3-5 chronic kidney disease [J]. *Biomarkers*, 2014, 19(4): 275-280.

[16] 林杰, 徐力辛, 杨德业, 等. 川芎嗪对内皮祖细胞的功能影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5): 598-600.

[17] 李秀丽, 宋瑞霞, 余静, 等. 四种黄芪黄酮类化合物单体对血管内皮细胞功能的保护作用 [J]. 兰州大学学报 (医学版), 2011, 37(4): 1-5, 9.

[18] Wu Y, Shi X S, Wang S S, *et al.* Protective role of polysaccharide on endothelium cells induced by atherosclerosis [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2005, 9(23): 238-240.

[19] 谷彬, 刘思好, 唐伟军, 等. 阿魏酸抑制高糖诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(1): 25-29.

[20] Oda T, Jung Y O, Kim H S, *et al.* PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(2): 587-596.

[21]

Zhang J, Gu C, Lawrence D A, *et al.* A plasminogen activator inhibitor type 1 mutant retards diabetic nephropathy in db/db mice by protecting podocytes[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(5): 802-815.

[22]

杜义斌, 吴 晓, 吴 峰, 等. 云南灯盏花胶囊对慢性肾功能衰竭大鼠 TGF- β 1 与 PAI-1 mRNA 表达及肾功能的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(4): 70-73.

[23]

Song X, Thalacker F W, Nilsen-Hamilton M. Synergistic and multidimensional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 expression by transforming growth factor type β and epidermal growth factor [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15): 12520-12528.

[24]

杨彦裕, 陈 琳, 魏明刚, 等. 加味当归补血汤通过调控 TGF- β 1/Smads/ILK 的表达对阿霉素肾病大鼠足细胞的保护作用[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1877-1883.

[25]

高嘉妍, 张勉之, 张大宁. 补肾活血法治疗慢性肾小球肾炎疗效观察[J]. 天津中医药, 2014, 31(3): 145-147.

[26]

张勉之, 张大宁. 张大宁治疗糖尿病肾病的临床经验[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8): 3141-3143.

[27]

Rüster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2985-2991.

[28]

Rüster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(7): 1189-1199.

[29]

Turner J M, Bauer C, Abramowitz M K, *et al.* Treatment of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(4): 351-362.

[30]

王晓杨, 毛宇飞. 川芎嗪及其在肾脏病中的应用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(3): 182-183.

[31]

李 勤, 李秉芝, 刘 宏. 川芎嗪注射液的药理作用和临床应用[J]. 医学综述, 2009, 15(9): 1402-1405.

[32]

陆 敏, 周 娟, 王 飞, 等. 川芎嗪对肾间质纤维化模型大鼠 Smad7 和 SnoN 蛋白表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 84-88.

小檗碱对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

邱胜卫¹, 王 彬², 蔡乃亮¹

(1. 海南省三亚市人民医院中医科, 海南 三亚 572000; 2. 海南省三亚市人民医院呼吸内科, 海南 三亚 572000)

摘要: **目的** 研究小檗碱对肺癌细胞 A549 增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 培养 THP-1 细胞并加入小檗碱后, MTT 法检测细胞增殖。100 ng/mL PMA 和 20 ng/mL IL-4 将 THP-1 细胞诱导成 M2 型肿瘤相关巨噬细胞, 小檗碱预给药后, 随机分为对照组、模型组、小檗碱组, 细胞培养上清与 A549 细胞共培养。RT-PCR、Western blot、ELISA 检测 CD206、IL-10、TGF- β 表达, Transwell 检测细胞迁移和侵袭。**结果** 小檗碱最佳刺激浓度为 20 μ mol/L。与模型组比较, 小檗碱组可显著抑制 CD206、IL-10、TGF- β 表达 ($P<0.05$)。小檗碱可抑制 THP-1 细胞转化为 M2 型肿瘤相关巨噬细胞。**结论** 小檗碱可调节 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移, 其机制可能与抑制肿瘤相关巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞的转化有关。

关键词: 小檗碱; 肿瘤相关巨噬细胞; 肺癌细胞 A549; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)07-1521-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.009

Effects of berberine on the proliferation, migration and invasion of A549 cells

QIU Sheng-wei¹, WANG Bin², CAI Nai-liang¹

(1. Department of Chinese Medicine, Hainan Provincial Sanya People's Hospital, Sanya 572000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Hainan Provincial Sanya People's Hospital, Sanya 572000, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of berberine on the proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells. **METHODS** Berberine was added with cultured THP-1 cells, after which cell proliferation was exam-

收稿日期: 2018-09-22

基金项目: 三亚市医疗卫生科技创新项目 (2017YW05)

作者简介: 邱胜卫 (1981—), 男, 主治医师, 研究方向为呼吸疾病。Tel: (0898) 88557733-4301, E-mail: qiushengwei33@126.com