

化痰解毒中药抑制梗阻性肾病巨噬细胞浸润减轻炎性损伤的作用

熊云昭^{1,2},王 萱^{1,2},常 奕^{2,3},王 箐^{2,3},郝 娟^{1,2},柴亚男^{1,2},王香婷^{2,3},许庆友^{2,3*}

¹河北中医学院研究生学院,石家庄 050091;²河北中医学院中西医结合学院,石家庄 050017;

³河北省中西医结合肝肾病证重点实验室,石家庄 050091

摘要:为观察化痰解毒中药对梗阻性肾病巨噬细胞浸润的影响及作用机制。将 48 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、依普利酮组、中药组,每组 12 只。除假手术组外,其余大鼠结扎单侧输尿管(UUO)复制肾间质纤维化动物模型。治疗组分别给以依普利酮(100 mg/kg/d 加入饲料喂养)和化痰解毒中药煎剂(14 g/kg/d 灌胃)。10 d 后摘取肾脏,观察大鼠肾脏组织病理改变。免疫组化法标记巨噬细胞浸润,免疫组化、Western Blot 方法检测血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶 1(SGK-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。肾脏病理显示,UUO 组大鼠肾脏有明显的肾小管扩张及上皮细胞脱落,间质巨噬细胞浸润增多和细胞外基质(ECM)大量积聚,SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 表达明显增强。化痰解毒中药可明显减轻 UUO 大鼠肾脏巨噬细胞等炎性细胞浸润和 ECM 沉积,下调 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 表达。以上结果说明化痰解毒中药可抑制梗阻性肾病诱导的巨噬细胞浸润,减轻肾脏炎性损伤。

关键词:化痰解毒中药;醛固酮;肾脏炎性损伤;巨噬细胞;单侧输尿管结扎

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0211-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.005

Inhibitory effects of Huayu Jiedu decoction on macrophage infiltration to alleviate inflammatory injury in obstructive nephropathy rats

XIONG Yun-zhao^{1,2}, WANG Xuan^{1,2}, CHANG-Yi^{2,3},

WANG Zheng^{2,3}, HAO Juan^{1,2}, CHAI Ya-nan^{1,2}, WANG Xiang-ting^{2,3}, XU Qing-you^{2,3*}

¹ Graduate School, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China;

² College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China;

³ Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-kidney patterns, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: To observe the effect of Huayu Jiedu decoction on macrophages infiltration in obstructive nephropathy rats, 48 male Wistar rats were randomly divided into sham group, UUO group, EPL group and ZY group ($n = 12$). Except the rats in sham group, the rats in the other groups were prepared unilateral ureteral obstruction (UUO) for renal interstitial fibrosis model. The rats were treated with 14 g/kg/d decoction of Chinese medicine in ZY group orally, and eplerenone at 100 mg/kg/d added to diet in EPL group. The kidneys were harvested to observe the histopathological changes at 10th day after surgery. Macrophage infiltration marked with F4/80 was examined by immunohistochemistry. The Serum and glucocorticoid induced kinase-1 (SGK-1), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected with immunohistochemistry and western blot. Renal pathology showed that renal tubular dilatation and epithelial cell shedding in UUO rats significantly. The infiltrated macrophage and accumulated extracellular matrix (ECM) also increased in interstitium of UUO rats markedly. The macrophages infiltration and ECM accumulation were attenuated by treated with Chinese herb decoction and eplerenone. Expressions of SGK-1, MCP-1, IL-1 and TNF- α were up-regulated in the UUO rats and were

收稿日期:2017-12-12 接受日期:2018-07-25

基金项目:国家自然科学基金(81473652);河北省自然科学基金(H2015423009, H2016423059);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015144, ZD 20166018)

* 通信作者 Tel:86-311-89926298; E-mail: qingyouxu@sohu.com

suppressed by Chinese herb decoction. Chinese herb decoction could inhibit the inflammatory injury via reducing macrophage infiltration in UUO rats.

Key words: Huayu Jiedu decoction; aldosterone; inflammatory injury of kidney; macrophage; UUO

炎性损伤是慢性疾病持续进展的关键,多种肾脏疾病都存在不同程度的炎性反应,诸多细胞因子和血管活性物质发挥着作用,其中醛固酮最为重要。当肾脏损伤时,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的激活可诱导盐皮质激素受体的活化,继而上调其效应介质血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶1(Serum and glucocorticoid induced protein kinase 1, SGK-1)的表达,导致肾脏炎性损伤参与肾间质纤维化的形成。在这一过程中,巨噬细胞(Macrophage)及炎性介质如单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1(Interleukin 1, IL-1)等起着重要作用。因此,阻断醛固酮活化所造成的炎性损伤对于减缓肾间质纤维化的进展具有重要意义。

本研究参照文献复制单侧输尿管结扎(Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)建立梗阻性肾间质纤维化的大鼠模型。通过激活 RAAS,诱导盐皮质激素受体活化,进而导致肾脏炎性损伤及间质纤维化。给予化瘀解毒中药及醛固酮受体拮抗剂依普利酮治疗,观察其对巨噬细胞标志物 F4/80 及炎性因子 MCP-1、IL-1、TNF- α 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用清洁级雄性 Wistar 大鼠 48 只,8 周龄,体质量 200 ± 20 g,购自河北医科大学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(冀)1205069。

1.2 实验试剂

SGK-1、MCP-1 抗体(Affbiotech 公司,中国);IL-1、TNF- α 、F4/80 抗体(Abcam 公司,美国);GAPDH 抗体(Bioworld Technology 公司,美国);免疫组化试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司,中国)。

1.3 仪器与设备

电泳仪及电泳槽(BIO-RAD);OLYMPUS VAN-OX PM-10AD 型显微照相仪(OLYMPUS 公司,日本);ODY-3059 扫描仪(Li-cor 公司,美国);超低温保存箱 MDF-382E(SANYO 公司,日本);DHG-9055A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司,中国);水浴箱 201-0(天津泰斯特仪器有限公

司,中国);恒温水浴震荡器 CU600(姜堰市医疗器械有限公司,中国);BD120 冰箱(青岛海尔股份有限公司,中国);高速冷冻离心机 1-15K(Sigma 公司,美国)。

1.4 梗阻性肾病大鼠模型制备

雄性 Wistar 大鼠 48 只,按照体重编号,根据随机数字表随机分为假手术组、UUO 组、依普利酮组、中药组($n = 12$)。于河北省中西医结合肝肾病证重点实验室饲养 7 天后进行实验,复制梗阻性肾病模型,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,于腹部左侧切开,游离左侧输尿管,于输尿管上 1/3 处和中 1/3 处分别用手术线结扎,离断输尿管并缝合皮肤。假手术组仅将输尿管游离。假手术组和模型组给予等量蒸馏水灌胃,治疗组分别给以化瘀解毒中药煎剂(14 g/kg/d)和依普利酮(100 mg/kg/d),每日 1 次。治疗 10 天后摘取左侧肾脏,部分肾组织置于 4% 多聚甲醛中固定、石蜡包埋,切片行常规 HE 及免疫组化染色;其余肾组织置于 -70 °C 保存用于 Western blot 检测蛋白表达。

1.5 实验用药及方法

依普利酮为美国 Pfizer 公司产品,由日本 Research Diets Inc 公司根据动物的进食量与药物用量(100 mg/kg/d)按 1.25 g/kg 加入饲料中;化瘀解毒中药(组成:黄芪 2 袋、醋鳖甲 1 袋、地龙 1 袋、僵蚕 1 袋、乌梢蛇 1 袋、丹参 2 袋、赤芍 1 袋、黄芩 1 袋、金银花 1 袋、公英 1 袋、大黄 1 袋)由广东一方制药有限公司提供中药配方颗粒,规格为每袋装 2.0 g,相当于临床使用量饮片 10 g。按比例混匀煎煮 15 min,水煎液含生药 0.43 kg/L,参照徐叔云《药理实验方法学》折合大鼠用量为 14 g/kg/d 给药。依普利酮组给予依普利酮 100 mg/kg/d 加入饲料喂养,中药组给予化瘀解毒中药煎剂 14 g/kg/d 灌胃。

1.6 肾组织标本制作及观察

1.6.1 HE 染色观察肾脏组织形态学改变

采用苏木精-伊红(HE)染色,观察各组大鼠肾脏组织病理改变。

1.6.2 免疫组化检测 F4/80、MCP-1、IL-1、TNF- α 表达

采用 ABC 法观察肾组织中 F4/80(1:100)、

MCP-1(1:100)、IL-1(1:100)及TNF- α (1:100)的表达,以镜下观察到棕黄色颗粒为阳性表达。PBS替代二抗作为染色阴性对照。

1.6.3 Western Blot 检测 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 蛋白表达

冰冻肾组织 100 mg 加裂解液(含蛋白酶抑制剂)0.4 mL,提取蛋白并测定含量;取样品上样蛋白 20~60 ug,电泳后转膜,5%脱脂牛奶封闭,加入一抗 SGK-1、MCP-1、IL-1、GAPDH 抗体(1:1000),TNF- α 抗体(1:500),4℃过夜,清洗3次,加入兔二抗(1:20000)孵育后显影,与所得内参进行校正后比较。

1.7 统计学方法

数据资料采用 SPSS21.0 软件进行统计处理。采用单因素方差分析(One-way ANOVA),数值变量以 Mean \pm SD 表示,组间比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏组织病理学改变

由图1可知,HE染色结果假手术组肾组织结

构正常,肾小管上皮细胞排列整齐,间质无水肿及扩张,少量炎性细胞浸润;UUO组大鼠肾脏肾小管扩张明显,远端小管尤为显著,上皮细胞脱落,间质大量炎性细胞浸润;依普利酮组及中药组远端小管扩张程度及上皮细胞脱落与UUO组大致相同,但炎性细胞浸润较UUO组明显减少。

2.2 免疫组化法检测肾组织 F4/80、MCP-1、IL-1、TNF- α 表达

由图1可知,F4/80在假手术组中偶见表达,模型组阳性细胞明显增多,以肾间质为甚;中药及依普利酮组与模型组相比,F4/80阳性细胞数明显减少,表明中药及依普利酮可以抑制巨噬细胞浸润,继而减轻肾脏损伤。

由图1可知,假手术组MCP-1、IL-1、TNF- α 呈弱表达,主要表达于肾小管上皮细胞;模型组中MCP-1、IL-1、TNF- α 表达明显增强,主要见于肾小管上皮及间质细胞;中药及依普利酮组MCP-1、IL-1、TNF- α 表达范围及强度较模型组均明显减弱,结果显示化痰解毒中药可以抑制炎性介质表达。

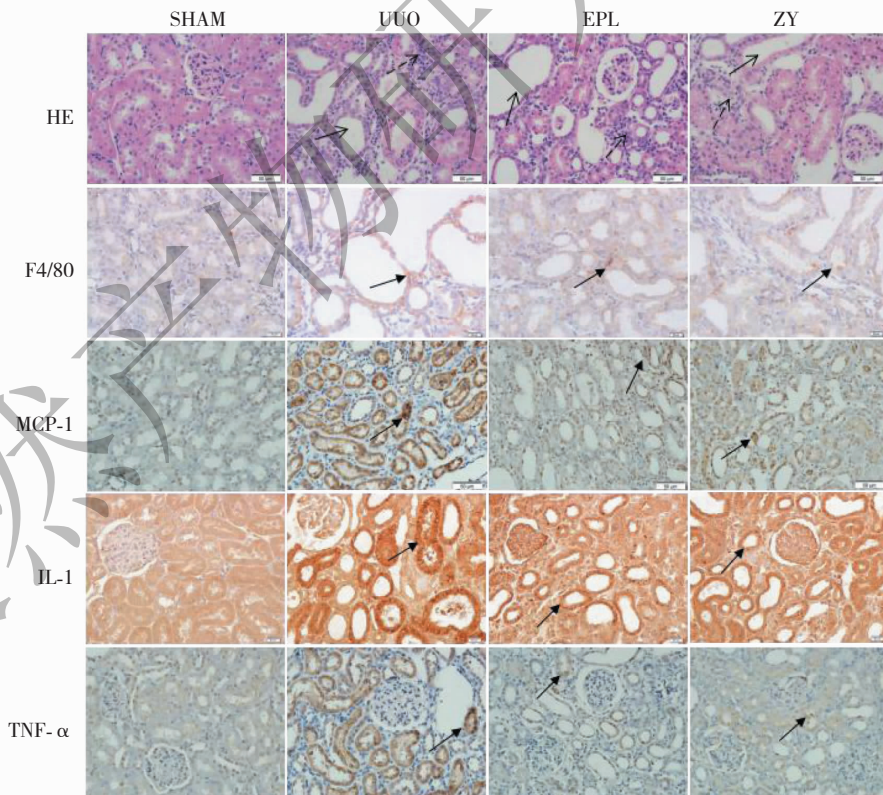


图1 大鼠肾脏组织苏木精-伊红染色病理改变结果及 F4/80、MCP-1、IL-1、TNF- α 免疫组化结果

Fig. 1 HE staining of kidney in rats with UUO and expression of F4/80、MCP-1、IL-1、TNF- α in kidneys of UUO rats with immunohistochemistry ($\times 400$)

注: \longrightarrow 扩张的肾小管; $-\ - - \rightarrow$: 炎性细胞; \rightarrow : F4/80、MCP-1、IL-1、TNF- α 在肾小管上皮细胞的表达。

Note: \longrightarrow The expansion of the renal tubules; $-\ - - \rightarrow$: Inflammatory cells; \rightarrow : Expression of F4/80、MCP-1、IL-1、TNF- α in renal tubular epithelial cells.

2.3 Western blot 检测 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 的蛋白表达

采用 Western Blot 检测肾组织 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 的蛋白表达,由图 2 可知,结果显示模

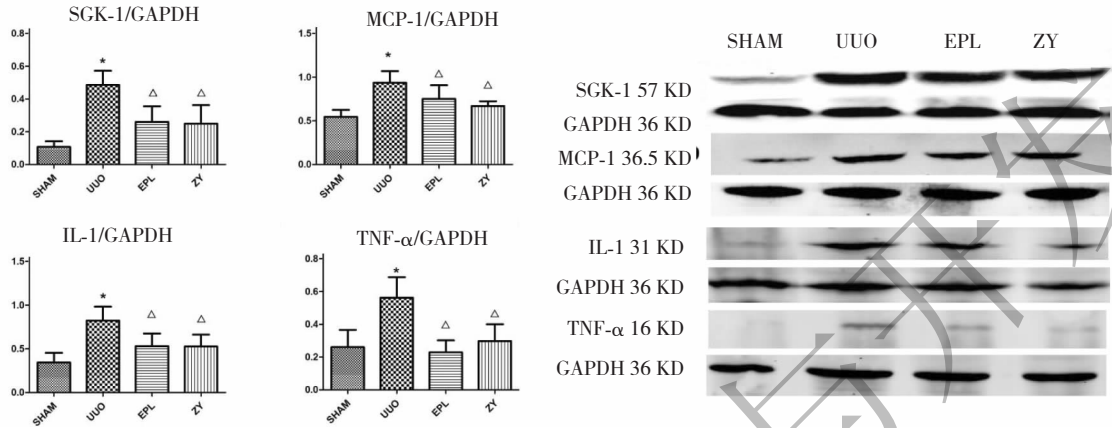


图 2 Western blot 检测 UUO 大鼠肾脏 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 表达

Fig. 2 The protein expression of SGK-1, MCP-1, IL-1, TNF- α in UUO rats with Western blot

注:与 SHAM 组比较, * $P < 0.05$; 与 UUO 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note: vs SHAM group, * $P < 0.05$; vs UUO group, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来,人们对炎性损伤在慢性疾病中的作用有了深刻的认识。尽管起始原因有多种,疾病持续进展中,炎性损伤是关键因素,故抗炎治疗成为新的靶点^[1]。肾脏病进展中,炎性介质同样发挥着重要作用,可刺激细胞增殖^[2]、转化。

炎症损伤可因于感染因素,这是肾脏病诱发或加重的常见原因,但更有意义的是体内血管活性物质等代谢异常所引起的内源性损伤。醛固酮在炎症损伤过程中发挥着重要作用, Hans Selye 于 1955 年论述了醛固酮在诱导炎症方面的作用^[3],指出盐皮质激素是诱导炎症的物质。近年来,随着对肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的深入研究,认识到醛固酮(ALD)是肾纤维化过程中的关键因素。ALD 不仅可以导致钠水潴留,而且可以促进组织胶原沉积、纤维化,如肾脏、心脏、肝、肺等器官组织的纤维化^[4],也诱导氧化应激与炎症损伤^[5,6],诱导肾脏固有细胞增殖^[7],给以盐皮质激素受体阻断剂,可有效减轻炎症损伤及间质纤维化改变^[8]。

经过临床验证,中医中药在治疗慢性肾脏病方面发挥着重要作用,已有研究表明化瘀通络中药可通过上调肾小球足细胞裂孔膜蛋白的表达,减少尿蛋白,延缓糖尿病肾病病程进展^[9],故研究中医中药的作用机制对于临床治疗有着重要的意义。根据

型组 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 表达较假手术组明显增强($P < 0.05$);化瘀解毒中药及依普利酮治疗可下调其表达,有统计学差异($P < 0.05$)。

“久病入络”、“久病必虚”、“久病必瘀”的中医理论,结合临床实践和现代研究,我们认为“虚、毒、瘀”是慢性肾脏病的基本病机,“虚为本,瘀为果,毒为凶”,因此拟定了益气活血解毒通络的中药治疗。化瘀解毒中药主要由黄芪、醋鳖甲、地龙、僵蚕、乌梢蛇、丹参、赤芍、黄芩、金银花、公英、大黄组成。诸药相伍共奏益气活血化痰通络,标本兼顾之功效。

醛固酮的作用途径有多种,其中血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 (SGK-1) 途径在炎症损伤中最为重要。醛固酮可以刺激 SGK-1 迅速表达并上调,在梗阻性肾病大鼠实验中,醛固酮活化诱导 SGK-1 在肾组织中表达增强,与肾脏炎症反应及纤维化呈正相关^[10]。

巨噬细胞浸润并分泌炎性介质,刺激细胞增殖参与肾脏纤维化^[11],有效抑制巨噬细胞浸润,对于减轻肾脏炎性损伤、抑制细胞增殖有重要意义。巨噬细胞浸润过程中,MCP-1 发挥着重要作用。作为单核/巨噬细胞特异性趋化物和结合物,MCP-1 趋化和激活单核/巨噬细胞至炎症部位;还可活化并促进血管平滑肌细胞、肾小管上皮细胞等固有细胞分泌炎症介质如 IL-1,进一步放大炎症信号;活化的单核/巨噬细胞同时可以分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[11]。TNF- α 是公认的直接炎性因子,在体内介导了广泛的细胞反应,是参与多种生理和免疫过程的

重要递质^[12]。TNF- α 可刺激系膜细胞表达黏附分子、血管活性肽等细胞因子,并刺激成纤维细胞增生,促进胶原纤维的沉积。TNF- α 的产生与多种因素有关,在梗阻性肾病中,其高表达考虑为醛固酮所介导。

本实验通过采用 UUO 方式复制肾间质纤维化模型,激活 RAAS 系统,诱导醛固酮活化通过巨噬细胞浸润介导肾脏炎症反应,给予化瘀解毒中药和醛固酮受体拮抗剂依普利酮治疗后,结果显示化瘀解毒中药可以下调 SGK-1、MCP-1、IL-1、TNF- α 等相关指标的表达,抑制巨噬细胞浸润,进而抑制梗阻性肾病炎症反应从而达到减轻肾间质纤维化的作用。

本研究主要观察醛固酮诱导的炎性损伤以及信号传导,结果显示梗阻性肾病诱导的醛固酮活化通过巨噬细胞浸润、介导肾脏炎症反应,参与纤维化进展,给予化瘀解毒中药治疗后,炎性细胞浸润、炎性介质表达及纤维化程度均得以抑制。

致谢:本实验主要在河北省中西医结合肝肾病重点实验室完成,在此对实验室的各位老师及同学的帮助致以衷心的感谢!

参考文献

- 1 Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities [J]. *Science*, 2013, 339: 166-172.
- 2 Gezgin OS, Tunali S, Yanardag R, et al. Effects of Z-FA. FMK on D-galactosamine/tumor necrosis factor-alpha-induced kidney injury and oxidative stress in mice: effects of Z-FA. FMK on TNF-alpha-mediated kidney injury [J]. *Mol Cell*

Biochem, 200, 309(1-2): 9-20.

- 3 Hans Selye. Anticortisol: action of aldosterone [J]. *Science*, 1995, 121: 368-369.
- 4 Hol benberg NK. Aldosterone in the development and progression of renal injury [J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 1-9.
- 5 Siragy HM, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93: 817-824.
- 6 Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone [J]. *J Vasc Res*, 2013, 50(2): 89-99.
- 7 Qin D, Morita H, Inui K, et al. Aldosterone mediates glomerular inflammation in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *J Nephrol*, 2013, 26: 199-206.
- 8 Akira N, Li Y, Yu YF, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability [J]. *Hypertension*, 2005, 45: 710-716.
- 9 Huo BB, Bai L, Zhang X, et al. Protective effect of different combinations of chinese recipe of stasi-removing and collaterals-dredging on the kidney of diabetic nephropathy rats and its effect on the expression of P-cadherin in the glomerular [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1558-1562.
- 10 Wang Z, Liang LJ, Wang CH, et al. Effects of shenluotong on inflammatory mediators and serum glucocorticoid-induced protein kinase 1 in rats with obstructive nephropathy [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2014, 55(1): 53-56.
- 11 Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis [J]. *Nature*, 2014, 10: 493-503.
- 12 Feldmann M, Maini RN. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases [J]. *Nature Medicin*, 2003, 9: 1245-1250.

(上接第 210 页)

- 13 Lin L, Ren L, Wen L, et al. Effect of evodiamine on the proliferation and apoptosis of a549 human lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 2832-2838.
- 14 Sui H, Zhou LH, Zhang YL, et al. Evodiamine suppresses abcg2 mediated drug resistance by inhibiting p50/p65 NF- κ b pathway in colorectal cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117: 1471-1481.
- 15 Zhao LC, Li J, Liao K, et al. Evodiamine induces apoptosis

and inhibits migration of hct-116 human colorectal cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 27411-27421.

- 16 Liu AJ, Wang SH, Chen KC, et al. Evodiamine, a plant alkaloid, induces calcium/jnk-mediated autophagy and calcium/mitochondria-mediated apoptosis in human glioblastoma cells [J]. *Chem-Biol Interact*, 2013, 205(1): 20-28.
- 17 Yang J, Cai X, Lu W, et al. Evodiamine inhibits stat3 signaling by inducing phosphatase shatterproof 1 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328: 243-251.