

三七总皂苷对顺铂致肾损伤大鼠肾组织纤维化的改善作用及对相关因子表达的影响^Δ

席加喜^{1*}, 张华君¹, 陈晓宇¹, 杨玉芳²(1. 广西壮族自治区人民医院药学部, 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属第一医院药学部, 南宁 530021)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1037-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.06

摘要 目的: 研究三七总皂苷(PNS)对顺铂致肾损伤模型大鼠肾组织纤维化的改善作用及对相关因子的影响。方法: 将72只SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物组和PNS低、中、高剂量组, 每组12只。除空白组外, 其余各组大鼠采用顺铂尾静脉注射(3 mg/kg×4次)建立肾损伤模型。从首次注射顺铂后第1天开始, 阳性组大鼠腹腔注射安磷汀溶液(1.0 mg/kg), PNS各剂量组大鼠腹腔注射PNS溶液(15.63、31.35、62.70 mg/kg), 空白组和模型组大鼠注射等体积生理盐水, 给药体积均为0.2 mL, 连续给药60 d。收集大鼠24 h尿液, 检测 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、24 h尿蛋白(Upro/24 h)含量; 检测大鼠血清中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)含量; 采用逆转录荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫组化法分别检测大鼠肾组织中结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、I型胶原(Col-1)、金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)、纤溶酶原激活物抑制物1(PAI-1)的mRNA和蛋白表达水平。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠尿液中NAG、Upro/24 h含量, 血清中Scr、BUN含量, 以及肾组织中CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较, PNS各剂量组大鼠上述尿液和血清生化指标含量均显著降低; PNS各剂量组大鼠肾组织中CTGF、TGF- β_1 的mRNA表达水平和CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1蛋白表达水平, PNS高剂量组Col-1的mRNA表达水平, PNS中、高剂量组TIMP-1的mRNA表达水平和PAI-1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与阳性组比较, PNS中、高剂量组大鼠尿液中NAG、Upro/24 h含量显著降低($P < 0.05$)。结论: PNS能有效改善顺铂致肾损伤模型大鼠的肾功能, 其可能通过下调肾组织中肾纤维化相关性因子CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的表达, 从而发挥减轻顺铂致肾纤维化的作用。

关键词 三七总皂苷; 顺铂; 肾纤维化; 结缔组织生长因子; 转化生长因子 β_1 ; I型胶原; 金属蛋白酶组织抑制因子1; 纤溶酶原激活物抑制物1; 大鼠

Improvement Effects of Panax Notoginsenosides on Renal Fibrosis in Cisplatin-induced Renal Injury Rats and Its Effects on the Expression of Renal Fibrosis Related Factors

XI Jiayi¹, ZHANG Huajun¹, CHEN Xiaoyu¹, YANG Yufang²(1. Dept. of Pharmacy, Guangxi Zhuang Autonomous Region People's Hospital, Nanning 530021, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study improvement effects of Panax notoginsenoside (PNS) on cisplatin-induced renal injury model rats and its effects on related factors. METHODS: Totally 72 SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive drug group and PNS low-dose, medium-dose, high-dose groups, with 12 rats in each group. Except for blank group, other groups were given cisplatin via tail vein (3 mg/kg×4 times) to establish renal injury model. Since the first day after the first injection of cisplatin, positive group was given anfosine solution intraperitoneally (1.0 mg/kg); PNS groups were given PNS solution intraperitoneally (15.63, 31.35, 62.70 mg/kg); blank group and model groups were given constant volume of normal saline 0.2 mL, for consecutive 60 d. The 24 h urine of rats was collected; the contents of β -N-acetylamino glycosidase (NAG) and 24 h urine protein (Upro/24 h) were detected; the serum contents of Scr and BUN were detected. mRNA and protein expression of CTGF, TGF- β_1 , Col-1, TIMP-1 and PAI-1 in renal tissue were determined by RT-PCR and immunohistochemistry respectively. RESULTS: Compared with blank group, the contents of NAG and Upro/24 h in urine, serum contents of Scr and BUN, mRNA and protein expression levels of CTGF, TGF- β_1 , Col-1, TIMP-1 and PAI-1 in renal tissue were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the contents of above urine and serum biochemical indicators were decreased significantly in PNS groups; mRNA expression of CTGF and TGF- β_1 and protein expression of CTGF, TGF- β_1 , Col-1 and TIMP-1 in renal tissue of rats in PNS groups, mRNA expression of Col-1 in PNS high-dose group, and mRNA expression of TIMP-1 and protein expression of PAI-1 in PNS medium-dose and high-dose groups were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with positive group, the

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81260598)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 抗肿瘤药物药理及毒理。电话: 0771-2186165。E-mail: 543908024@qq.com

contents of NAG and Upro/24 h in urine were decreased significantly in PNS medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: PNS can effectively improve the

renal function of cisplatin-induced renal injury model rats, and relieve cisplatin-induced renal fibrosis by decreasing the expression of renal fibrosis related factors as CTGF, TGF- β_1 , Col-1, TIMP-1 and PAI-1 in renal tissue.

KEYWORDS Panax notoginsenosides; Cisplatin; Renal fibrosis; Connective tissue growth factor; Transforming growth factor β_1 ; Type I collagen; Tissue inhibitor of metalloproteinase 1; Plasminogen activator inhibitor 1; Rat

顺铂是临床常用的广谱化疗药物,也是联合化疗方案的重要组成,对各种实体瘤具有良好的疗效,是治疗肺癌、胰腺癌、头颈部肿瘤的一线选择^[1-2],是乳腺癌等肿瘤多线治疗的主要药物^[3]。顺铂作为第一代铂类药物,临床不良反应明显,常见有肾功能损伤、胃肠道反应、骨髓抑制等^[4]。其中肾毒性是顺铂的剂量限制性毒性,与剂量成正比,病理表现为肾小管上皮细胞坏死、变性和肾间质水肿等^[5],但其机制目前尚不明确。三七总皂苷(PNS)是中药三七的提取物,含有人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}、三七皂苷R₁等多种单体皂苷成分,具有抗炎、抗心血管、改善微循环、抗肿瘤以及抗氧化等药理活性^[6-8]。本课题组前期研究发现,PNS能有效降低顺铂致肾损伤大鼠尿液中 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、尿蛋白水平,降低血肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平,并能升高肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)水平,降低丙二醛(MAD)水平,提示其能通过抗氧化作用改善顺铂致肾损伤^[9]。在上述研究过程中发现,大鼠肾组织出现轻微纤维化,而以往未见顺铂致肾损伤大鼠出现肾纤维化改变的文献报道。基于此,本研究通过延长大鼠造模时间和药物处理时间,并检测肾纤维化相关因子如重组结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、I型胶原(Col-1)、金属蛋白酶组织抑制物1(TIM-1)、纤溶酶原激活物抑制物1(PAI-1)的变化,以考察顺铂长期给药可否导致大鼠肾纤维化和PNS对这一病理变化的改善作用及机制。

1 材料

1.1 仪器

DS-88型电子秤(武汉自动化仪表厂);KD-BM型包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);RM2016型切片机(上海徠卡仪器有限公司);聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Life Technologies公司);Thermo Forma 725型超低温冰箱(美国Forma公司);WH-1型微型旋涡混合器(上海沪西分析仪器厂);5810R型高速冷冻多用离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

PNS粉末(中恒集团梧州制药有限公司,批号:20110115);注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:1020032DB,规格:20 mg);注射用安磷汀(大连美罗大药厂,批号:53110301,规格:0.4 g);NAG检测试剂盒、尿蛋白检测试剂盒、Scr检测试剂盒、BUN检测试剂盒(南

京建成生物有限公司);cDNA逆转录试剂盒(美国Fermentas公司);兔抗大鼠CTGF多克隆抗体、兔抗大鼠Col-1多克隆抗体、兔抗大鼠PAI-1多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗大鼠TGF- β_1 多克隆抗体、兔抗大鼠TIMP-1多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);PCR Marker100-600(广州东盛生物科技有限公司);PCR扩增引物、5×TBE电泳缓冲液[生工生物工程(上海)有限公司];琼脂糖(西班牙Biowest公司);氯化钠注射液(中国大冢制药有限公司,规格:500 mL:4.5 g;可作生理盐水使用);其余试剂为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 动物

成年健康雄性SD大鼠,体质量160~180 g,购自广西医科大学医学实验动物中心,实验动物生产许可证:SCXK(桂)2014-0002。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将72只大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组和PNS低、中、高剂量组,每组12只。空白组大鼠尾静脉注射等量生理盐水;其余各组大鼠尾静脉注射顺铂溶液(3 mg/kg,临用前以生理盐水溶解制备,剂量根据成人单个疗程总剂量换算并结合预实验结果制定)0.2 mL,每2周(14 d)注射1次,连续4次,以建立顺铂致肾损伤大鼠模型。从首次注射顺铂后第1天开始,阳性组大鼠腹腔注射安磷汀溶液(1.0 mg/kg,临用前以生理盐水溶解制备,剂量按药品说明书的成人剂量换算制定),PNS各剂量组大鼠腹腔注射PNS溶液(15.63、31.35、62.70 mg/kg,临用前以生理盐水溶解制备,剂量按前期研究结合预实验结果制定),给药体积均为0.2 mL,连续给药60 d;空白组和模型组大鼠同法注射等体积生理盐水。

2.2 大鼠尿液中NAG、24 h尿蛋白含量的检测

末次给药后,收集大鼠24 h尿液,3 500 r/min离心10 min,取上清液,严格按照相应试剂盒说明书要求操作,采用硝基酚比色法检测NAG含量,采用考马斯亮蓝法检测24 h尿蛋白(Upro/24 h)含量。

2.3 大鼠血清中Scr、BUN含量的检测

在收集完大鼠24 h尿液后,以20%乌拉坦麻醉大鼠,于其腹主动脉取血,3 500 r/min离心10 min,取上层血清,严格按照相应试剂盒说明书要求操作,以苦味酸法检测Scr含量,以二乙酰一肟法检测BUN含量。

2.4 大鼠肾组织中 CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1 的 mRNA 表达检测

2.4.1 肾组织总 RNA 的提取和测定 大鼠腹主动脉取血后,在肾动脉分支以下行腹主动脉插管,夹闭肾动脉分支以上的近心段,剪开左肾静脉,以 2~4 ℃ 的生理盐水原位灌洗肾脏。待肾脏颜色由红变白后,剪下右侧肾脏,并沿中线切开,一半立即液氮罐保存,用于提取 RNA 和 PCR 检测,另一半置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于石蜡切片和免疫组化检测。

取液氮罐中肾组织解冻,按下列步骤提取总 RNA:肾组织(20~30 mg)加 Trizol 试剂冰浴匀浆,加氯仿震荡,2~4 ℃ 低温静置,并在低温下 12 000 r/min 离心 15 min。取上层无色水相,加入-20 ℃ 预冷的异丙醇 0.5 mL 混匀,静置 30 min,在低温下 12 000 r/min 离心 10 min。取附壁沉淀加 75% 乙醇冲洗溶解,溶解液 7 500 r/min 离心 5 min,低温静置后除残留液,加 DEPC 处理水溶解,得总 RNA 溶液。取总 RNA 溶液 5 μL 加溴酚蓝 1 μL 混匀,90 V 条件下以 0.1% 琼脂糖凝胶电泳 15 min,核酸染料显色,采用凝胶成像分析系统分析结果。

2.4.2 RT-PCR 检测 PCR 反应体系:cDNA 模板,2 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,2×PCR Taq Mix 12.5 μL,以水补充至终体积 25 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 50 s,56 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取上述反应液加样,100 V 条件下以 0.1% 琼脂糖凝胶电泳 23 min,核酸染料显色,采用凝胶成像分析系统测定光密度(OD),以目的基因和 β-actin 条带 OD 之比表示目的基因的 mRNA 表达水平。各引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab 1 RT-PCR primer sequences

待测基因	引物序列
β-actin	上游 5'-GAGAGGAAATC GTGCGTGAC-3'
	下游 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'
CTGF	上游 5'-ATCCCTGCGACCCACACAAG-3'
	下游 5'-CAACTGCTTTGGAAGGACTCG C-3'
TGF-β ₁	上游 5'-GGGGCAGTCAAGAGCAA-3'
	下游 5'-GAACCT TTCATATTTAGGTGGT-3'
Col-1	上游 5'-TCCAGCGGTGGTTATG-3'
	下游 5'-GGTTGCAGCCTTGGTTAG-3'
TIMP-1	上游 5'-GACCTGGTCATAAGG GCTAAA-3'
	下游 5'-GCCCGTGATGAGAACTCTTCACT-3'
PAI-1	上游 5'-ATGAGATCAGTACTGCGGAGCCATCTTTG-3'
	下游 5'-GCACGGAGATGG TGCTACCATCACTTGT-3'

2.5 大鼠肾组织中 TGF-β₁、CTGF、Col-1、TIMP-1、PAI-1 的蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.4.1”项下固定的肾组织标本,乙醇梯度脱水,二甲苯透明处理,石蜡包埋后制作石蜡切片;严格按照免疫组化检测试剂盒说明书操

作,于显微镜下观察组织细胞染色情况,以棕褐色染色判断为阳性染色。采用 PTPS-2011 彩色病理图文分析系统计算积分光密度(IOD),作为样本的免疫组化指数,用以表示 TGF-β₁、CTGF、Col-1、TIMP-1、PAI-1 的蛋白表达水平。IOD=OD×阳性染色面积。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠尿液和血清生化指标的检测结果

与空白组比较,模型组大鼠尿中 NAG 和 Upro/24 h、血清 Scr 和 BUN 含量均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性组和 PNS 各剂量组大鼠尿中 NAG 和 Upro/24 h、血清 Scr 和 BUN 含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与阳性组比较,PNS 中、高剂量组大鼠尿中 NAG 和 Upro/24 h 含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其余指标含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠 NAG、Upro/24 h、Scr、BUN 含量检测结果见表 2。

表 2 各组大鼠 NAG、Upro/24 h、Scr、BUN 含量($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Tab 2 Content of NAG, Upro/24 h, Scr and BUN in rats of each group($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	尿液		血清	
	NAG, U/L	Upro/24 h, mg/d	Scr, μmol/L	BUN, mmol/L
空白组	2.311 ± 0.287	5.781 ± 0.721	67.893 ± 9.674	8.650 ± 0.925
模型组	7.211 ± 0.921 [*]	18.632 ± 3.955 [*]	145.877 ± 15.801 [*]	15.167 ± 2.098 [*]
阳性组	4.182 ± 0.542 ^Δ	9.832 ± 1.728 ^Δ	97.834 ± 11.095 ^Δ	9.563 ± 2.119 ^Δ
PNS 低剂量组	4.552 ± 0.618 ^Δ	10.045 ± 3.109 ^Δ	117.642 ± 9.056 ^Δ	12.986 ± 3.291 ^Δ
PNS 中剂量组	3.476 ± 1.032 ^{Δ#}	8.062 ± 1.785 ^{Δ#}	104.882 ± 16.452 ^Δ	10.897 ± 2.881 ^Δ
PNS 高剂量组	2.629 ± 0.602 ^{Δ#}	6.088 ± 2.534 ^{Δ#}	94.822 ± 9.856 ^Δ	8.905 ± 3.201 ^Δ

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$;与阳性组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. blank group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, ^Δ $P < 0.05$; vs. positive group, [#] $P < 0.05$

3.2 各组大鼠肾组织中 CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1 的 mRNA 表达水平检测结果

3.2.1 大鼠总 RNA 的纯度和完整性 提取的总 RNA 标本经测定,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 范围之内,提示无明显蛋白质或 DNA 干扰,符合纯度要求。凝胶电泳结果清晰呈现 18 S 条带和 28 S 条带,提示 RNA 完整、无降解,符合完整性要求。大鼠总 RNA 样本凝胶电泳图见图 1。

3.2.2 RT-PCR 检测结果 与空白组比较,模型组大鼠肾组织中 CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1 的 mRNA 表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性组大鼠肾组织中 CTGF、TGF-β₁、

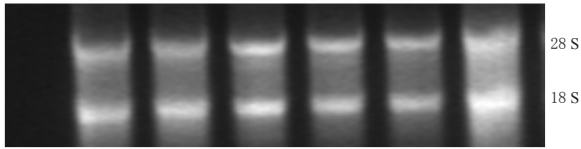


图1 总RNA样本凝胶电泳图

Fig 1 Gel electrophoresis of total RNA samples

Col-1、TIMP-1、PNS各剂量组CTGF、TGF-β₁、PNS高剂量组Col-1、PNS中、高剂量组TIMP-1的mRNA表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其余指标的mRNA表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。阳性组与PNS各剂量组比较,上述指标的mRNA表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠肾组织CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1的mRNA表达水平检测结果见表3。

表3 各组大鼠肾组织CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1的mRNA表达水平($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 3 mRNA expression levels of CTGF, TGF-β₁, Col-1, TIMP-1 and PAI-1 in renal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	CTGF	TGF-β ₁	Col-1	TIMP-1	PAI-1
空白组	0.338 ± 0.021	0.645 ± 0.042	0.586 ± 0.075	0.319 ± 0.028	0.353 ± 0.066
模型组	0.561 ± 0.026 [*]	0.803 ± 0.036 [*]	0.717 ± 0.034 [*]	0.422 ± 0.072 [*]	0.408 ± 0.018 [*]
阳性组	0.455 ± 0.061 ^Δ	0.711 ± 0.031 ^Δ	0.655 ± 0.026 ^Δ	0.404 ± 0.067 ^Δ	0.389 ± 0.056
PNS低剂量组	0.483 ± 0.082 ^Δ	0.755 ± 0.091 ^Δ	0.707 ± 0.066	0.421 ± 0.068	0.401 ± 0.083
PNS中剂量组	0.439 ± 0.032 ^Δ	0.714 ± 0.072 ^Δ	0.685 ± 0.083	0.397 ± 0.051 ^Δ	0.405 ± 0.043
PNS高剂量组	0.401 ± 0.047 ^Δ	0.683 ± 0.051 ^Δ	0.659 ± 0.074 ^Δ	0.390 ± 0.063 ^Δ	0.392 ± 0.069

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$; vs. model group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 各组大鼠肾组织中CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1蛋白表达水平检测结果

3.3.1 免疫组化染色现象 显微镜下可见,CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1蛋白仅在空白组大鼠的肾小管中呈现微量阳性染色或无染色;上述蛋白在模型组大鼠的肾间质(主要是损伤的肾小管上皮细胞)中阳性染色增多,部分呈强染色;上述蛋白在阳性组和PNS各剂量组大鼠的肾间质(主要是损伤的肾小管上皮细胞)中呈少量阳性染色,且强度减轻。PAI-1在空白组大鼠的少数血管壁和肾小管呈微量阳性染色或无染色;在模型组大鼠的血管壁和肾小管中的阳性染色增多,且部分呈强染色;在阳性组和PNS各剂量组大鼠的血管壁和肾小管中少量表达,且强度减弱。各组大鼠肾组织中CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1蛋白免疫组化显微图见图2~图6。

3.3.2 蛋白表达水平 与空白组比较,模型组大鼠CTGF、TGF-β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1的蛋白表达水平均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性组和PNS各剂量组大鼠肾组织中CTGF、TGF-

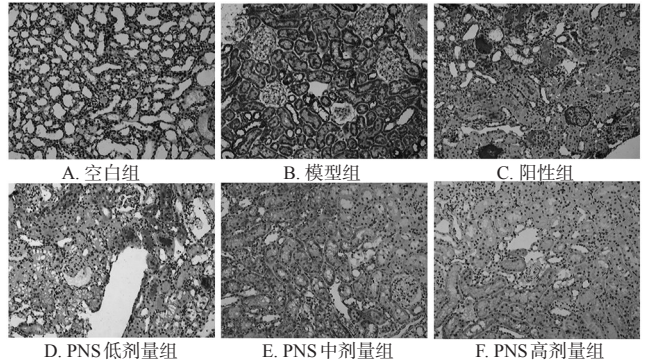


图2 各组大鼠肾组织中CTGF蛋白的免疫组化显微图(×400)

Fig 2 Immunohistochemical micrograph of CTGF protein in renal tissue of rats in each group (×400)

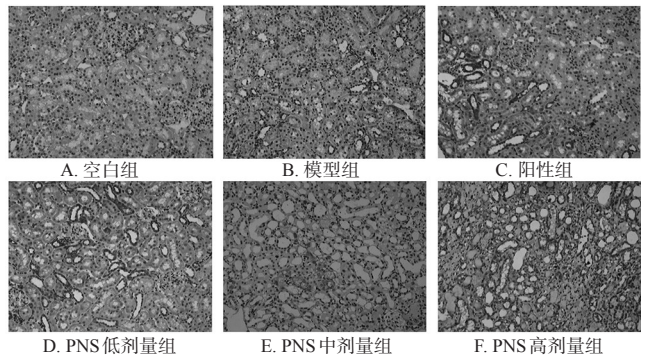


图3 各组大鼠肾组织中TGF-β₁蛋白的免疫组化显微图(×400)

Fig 3 Immunohistochemical micrograph of TGF-β₁ protein in renal tissue of rats in each group (×400)

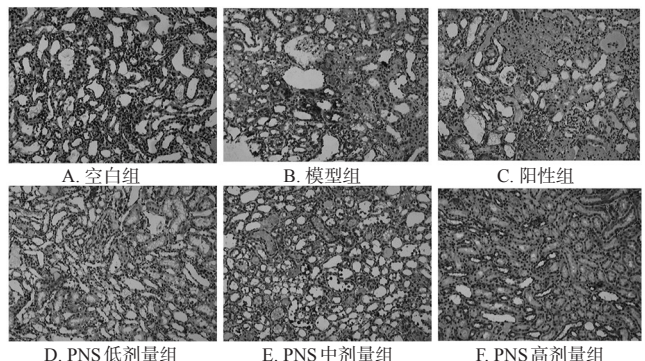


图4 各组大鼠肾组织中Col-1蛋白的免疫组化显微图(×400)

Fig 4 Immunohistochemical micrograph of Col-1 protein in renal tissue of rats in each group (×400)

β₁、Col-1、TIMP-1、PAI-1的蛋白表达水平均显著降低,除PNS低剂量组的PAI-1外,其余指标差异均有统计学意义($P < 0.05$)。阳性组与PNS各剂量组间比较,上述各指标的蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠肾组织中CTGF、TGF-β₁、PAI-1、Col-1、TIMP-1的蛋白表达水平检测结果见表4。

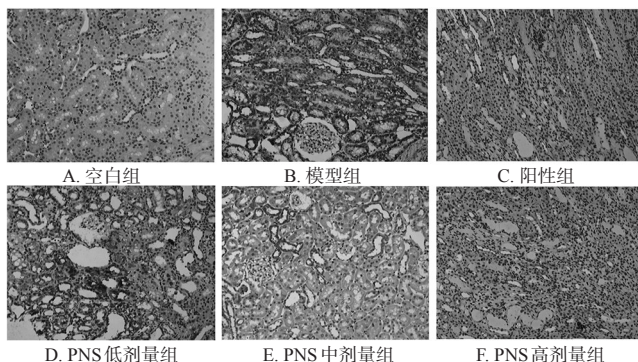


图5 各组大鼠肾组织中TIMP-1蛋白的免疫组化显微图($\times 400$)

Fig 5 Immunohistochemical micrograph of TIMP-1 protein in renal tissue of rats in each group ($\times 400$)

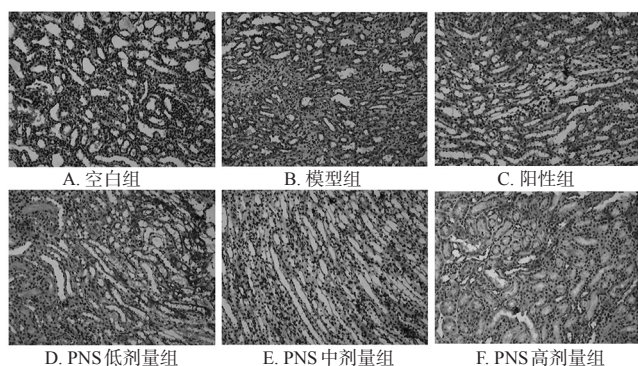


图6 各组大鼠肾组织中PAI-1蛋白的免疫组化显微图($\times 400$)

Fig 6 Immunohistochemical micrograph of PAI-1 protein in renal tissue of rats in each group ($\times 400$)

表4 各组大鼠肾组织中CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 4 Protein expression levels of CTGF, TGF- β_1 , Col-1, TIMP-1 and PAI-1 in renal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	CTGF	TGF- β_1	Col-1	TIMP-1	PAI-1
空白组	21.614 \pm 2.282	18.338 \pm 1.488	18.294 \pm 2.023	12.790 \pm 0.625	19.225 \pm 2.059
模型组	91.504 \pm 5.062 [*]	99.816 \pm 5.315 [*]	92.194 \pm 7.959 [*]	27.572 \pm 1.902 [*]	92.746 \pm 4.813 [*]
阳性组	74.489 \pm 5.552 ^Δ	78.208 \pm 5.764 ^Δ	81.993 \pm 5.681 ^Δ	21.776 \pm 1.108 ^Δ	81.491 \pm 4.299 ^Δ
PNS 低剂量组	74.487 \pm 6.274 ^Δ	81.641 \pm 5.873 ^Δ	80.004 \pm 4.487 ^Δ	19.986 \pm 1.109 ^Δ	86.400 \pm 2.816
PNS 中剂量组	77.936 \pm 6.619 ^Δ	80.463 \pm 6.103 ^Δ	78.952 \pm 6.022 ^Δ	19.693 \pm 0.567 ^Δ	82.302 \pm 4.384 ^Δ
PNS 高剂量组	71.216 \pm 5.380 ^Δ	74.761 \pm 5.578 ^Δ	72.756 \pm 6.432 ^Δ	17.066 \pm 0.429 ^Δ	80.784 \pm 3.109 ^Δ

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. blank group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, ^Δ $P < 0.05$

4 讨论

肾纤维化是各类肾脏疾病发展至终末期的病理学变化之一,病理切片表现为细胞外基质过度沉积于肾间质,并伴有肾小管周围毛细血管减少、肾小球萎缩、肾单位进行性破坏等^[10-11]。目前学术界普遍认为细胞外基质过度沉积是肾纤维化的原因。本课题组前期研究发现,

顺铂致肾损伤模型大鼠的病理观察结果显示出细胞外基质少量沉积于肾间质,并伴有少量的肾小球萎缩,提示大鼠发生轻微肾纤维化。为此,后期本课题组设计了验证实验,以正常成人患者每周期75 mg/m²、6个周期为1个疗程(总剂量为450 mg/m²)进行剂量换算,以顺铂3 mg/kg对大鼠尾静脉注射,每2周注射1次,结果6周后即可观察到大鼠发生肾纤维化。

研究发现,肾组织细胞外基质的降解主要依赖两大纤溶酶系统,即基质金属蛋白酶(MMP)系统和纤溶酶原激活物(PA)系统。MMP能降解大部分基质,但其可被TIMP所抑制而导致活性降低^[12]。TIMP有多种,其中TIMP-1和TIMP-2是基质降解平衡中的关键^[13]。PA可激活纤溶酶原转化为纤溶酶而起到降解细胞外基质的作用,但可被生理性抑制物PAI-1所抑制而导致其活性降低、降解作用减弱^[14]。另有研究发现,CTGF和TGF- β_1 对肾小管和肾小球上皮细胞均具有促进和抑制细胞有丝分裂、增殖的双重作用,且对细胞外基质的合成和沉积也有较强的刺激作用,在调节细胞外基质代谢及肾间质纤维化方面起到重要作用^[15-16]。

近年来,中药在肾纤维化的保护作用的相关研究报道众多,多种中药有效成分对各种原因导致的肾纤维化均显示出良好疗效^[17],中药制剂等也显示出对肾纤维化的治疗作用^[18]。PNS为中药三七的提取物,具有广泛的药理作用,其对单侧输尿管梗阻、阿霉素导致的肾纤维化^[19-20]等具有保护作用。

尿液NAG、Upro/24 h和血清Scr、BUN是常用的肾功能判定指标。本研究结果显示,造模后大鼠尿液中NAG、Upro/24 h和血清Scr、BUN的含量均显著增高,提示顺铂导致了大鼠肾损伤;给予PNS干预后,大鼠上述指标含量均显著降低,表明PNS能减轻大鼠肾损伤。结合前期研究结果,考虑这一作用可能与降低体内氧化应激反应有关。

肾小管上皮细胞转分化并诱发肌成纤维细胞的形成是肾小管病理改变和肾纤维化发生的主要机制^[21],而细胞因子在肾纤维化的发生发展中也起到了重要推动作用^[22]。本研究采用免疫组化法和RT-PCR法证实,造模后大鼠肾组织中CTGF、TGF- β_1 的mRNA表达水平和CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的蛋白表达水平均显著降低,提示其可能通过下调Col-1、TIMP-1、PAI-1的表达来减少细胞外基质的降解,并通过下调CTGF、TGF- β_1 来抑制肾小管上皮细胞的增殖,从而导致肾纤维化。给予PNS干预后,大鼠肾组织中CTGF、TGF- β_1 的mRNA表达水平和CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的蛋白表达水平均明显升高,提示其可能通过上调CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的表达,来减少细胞外

基质的沉积并促进肾小管上皮细胞增殖,从而减轻肾纤维化。

本研究结果还显示,高剂量PNS在改善肾功能方面(NAG,Upro/24 h)优于阳性对照药物,但对CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的蛋白表达的影响差异均无统计学意义。氨磷汀是临床推荐使用的顺铂肾毒性保护剂,其通过抗氧化作用降低机体氧化应激反应而减少肾损伤;而PNS具有广泛的药理作用,除了抗氧化作用,还能改善微循环等,提示其改善顺铂致大鼠肾纤维化是多种药理作用的共同结果。

综上所述,PNS能有效改善顺铂致肾损伤模型大鼠的肾功能,其可能通过下调肾组织中肾纤维化相关性因子CTGF、TGF- β_1 、Col-1、TIMP-1、PAI-1的表达,从而发挥减轻顺铂致肾纤维化的作用。

参考文献

[1] 李琛,洪洋,杨晓光,等.依托泊苷联合顺铂方案不同时期放射治疗局限性小细胞肺癌的临床研究[J].河北医科大学学报,2018,39(2):133-136,141.

[2] 徐子舒,吴欣爱.吉西他滨联合替吉奥与联合顺铂治疗晚期胰腺癌的疗效比较[J].中国现代医学杂志,2017,27(10):103-106.

[3] 李莉,王友群,孙蔚莉,等.含铂方案治疗晚期乳腺癌临床研究[J].中华肿瘤防治杂志,2016,23(10):657-662.

[4] YOUSEF MI, SAAD AA, EI-SHENNAWY LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats[J]. *Food Chem Toxicol*,2009,47(6):1176-1183.

[5] YU YN, CHEN H, LI Y. Protect effect of bicyclol on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice[J]. *Arch Toxicol*,2009,83(4):381-387.

[6] 韩淑娴,游云.三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应[J].中国中药杂志,2016,41(5):818-822.

[7] 方鹏飞,常丽霞,宋渊.三七总皂苷临床应用研究进展[J].中医药学报,2016,44(3):120-123.

[8] 黄家林,田代雄.三七总皂苷抗炎免疫药理研究进展[J].中华中医药杂志,2016,31(11):4657-4660.

[9] 席加喜,刘晓霞,杨玉芳,等.血栓通对顺铂肾损伤大鼠的肾功能和氧化指标的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):225-228.

[10] 杨茹茜,徐倩,杨旖,等.黄芪甲苷对肾纤维化小鼠 Toll/MyD88 依赖性通路的作用研究[J].中草药,2017,48(18):3775-3782.

[11] 李才,张一宁,牛俊奇,等.器官纤维化基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2003:31-36.

[12] 张洁帅,钟希文,戴卫波,等.鳄嘴花鲜药对阿霉素NS模型抗肾纤维化作用的研究[J].时珍国医国药,2018,29(4):855-857.

[13] 崔李平,王玉丽,张士俊,等.甘草次酸衍生物对大鼠肾损伤的保护作用[J].中草药,2011,42(6):1177-1179.

[14] 徐妍.厄贝沙坦对糖尿病大鼠肾脏MMP-2/TIMP-2表达的影响[C]//中华医学会肾脏病学分会“中华医学会肾脏病学分会2004年年会”暨“第二届全国中青年肾脏病学学术会议”论文汇编.中华医学会肾脏病学分会,2004:1.

[15] 宋小乐. TGF- β_1 /Smad 信号转导通路对肾间质纤维化的影响[J].南昌大学学报(医学版),2011,51(6):92-95,98.

[16] 詹继红,何立群,刘铭洁.刺梨黄酮对诱导大鼠肾纤维化 TGF- β_1 /Smads 信号转导干预作用及机制分析[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):380-383,446.

[17] 王松,赵晓玉,梁艳,等.虎杖苷对肾纤维化模型大鼠肾组织中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达的影响[J].中国药房,2018,29(7):936-940.

[18] 胡坤媚,胡浩然,沈媛媛,等.中药玉夏胶囊对自发性高血压大鼠肾纤维化的改善作用及 TGF- β_1 /Smads 信号通路的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2017,22(4):387-393.

[19] XIE XS, YANG M, LIU HC, et al. Influence of ginsenoside Rg₁, a panaxatriol saponin from *Panax notoginseng*, on renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*,2008,9(11):885-894.

[20] 吴金玉,黄志敏,唐宇,等.三七注射液对阿霉素诱导的肾纤维化大鼠补体-炎症受体系统的影响[J].时珍国医国药,2018,29(4):796-799.

[21] 蔡长景,刘持,秦晓群.巨噬细胞参与肾纤维化的分子机制及治疗研究进展[J].广东医学,2014,35(5):770-774.

[22] 张新志,黄迪,吴锋,等.TGF- β_1 /p38 MAPK 通路对肾间质纤维化影响及抗纤灵冲剂干预机制的实验研究[J].中华中医药杂志,2011,26(2):245-248.

(收稿日期:2018-10-06 修回日期:2019-03-04)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅