金匮肾气丸对肾纤维化模型大鼠的干预作用及机制Δ

张明昊*，俎兆轩，张　童，郭　申，杜婧雯，赵　绅（河南中医药大学医学院，郑州　450046）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）15-1848-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.15.11

摘　要　目的 基于转化生长因子β_1/Smads（TGF-β_1/Smads）和TGF-β_1/细胞外信号调节激酶（TGF-β_1/ERK）信号通路探讨金匮肾气丸对肾纤维化模型大鼠的干预作用及机制。**方法** 将雄性SD大鼠灌胃腺嘌呤混悬液（250 mg/kg）以复制肾纤维化模型，造模成功后，按体质量随机分为模型组、秋水仙碱片组（阳性对照，0.45 mg/kg）和金匮肾气丸低、中、高剂量组（0.5、1、2 g/kg），每组10只；另取10只健康大鼠作为正常组。各药物组大鼠灌胃相应药液，正常组和模型组大鼠均灌胃羧甲基纤维素钠溶液，每天1次，连续30 d。末次给药后，检测大鼠血清中肌酐（Cr）、尿素氮（BUN）水平以及肾脏质量和体质量，并计算BUN/Cr比值及肾脏系数；观察大鼠肾脏组织的病理形态；检测大鼠肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2蛋白和mRNA的表达水平。**结果** 与正常组比较，模型组大鼠血清中Cr、BUN水平和肾脏系数均显著升高（$P<0.05$），BUN/Cr比值显著降低（$P<0.05$）；肾脏体积明显增大，表面颗粒化严重，可见系膜增生，肾小管扩张或萎缩，并伴有大面积胶原蛋白沉积等；肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2蛋白和mRNA的表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，金匮肾气丸各剂量组大鼠上述指标水平均显著逆转（$P<0.05$）；肾小管扩张或萎缩减轻，胶原蛋白沉积不同程度地减少。**结论** 金匮肾气丸可改善肾纤维化模型大鼠的肾脏功能，其作用机制可能与抑制TGF-β_1/Smads和TGF-β_1/ERK这2条信号通路有关。

关键词　金匮肾气丸；肾纤维化；TGF-β_1/Smads信号通路；TGF-β_1/ERK信号通路；机制

Intervention effects of Jinkui shenqi pills on renal fibrosis model rats and its mechanism

ZHANG Minghao, ZU Zhaoxuan, ZHANG Tong, GUO Shen, DU Jingwen, ZHAO Shen (School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the intervention effect of Jinkui shenqi pills on renal fibrosis (RF) model rats and its mechanism based on transforming growth factor β_1/Smads (TGF-β_1/Smads) and TGF-β_1/extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway. **METHODS** Male SD rats were given adenine suspension (250 mg/kg) to induce RF model. After modeling, they were randomly divided into model group, Colchicine tablet group (positive control, 0.45 mg/kg) and Jinkui shenqi pills low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.5, 1, 2 g/kg), with 10 rats in each group. Other 10 healthy rats were selected as normal group. The rats in administration groups were given the corresponding drugs intragastrically; normal group and model group were given 0.1% sodium carboxymethyl cellulose solution, once a day, for consecutive 30 d. After last medication, the serum levels of creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN), renal weight and body weight were detected. The ratio of BUN/Cr and renal coefficient were calculated. The pathological morphology of renal tissue in rats were observed. The protein and mRNA expressions of TGF-β_1, Smad2, Smad3, ERK1 and ERK2 were detected. **RESULTS** Compared with normal group, serum levels of Cr and BUN and renal coefficient were all increased significantly in model group ($P<0.05$), while the ratio of BUN/Cr was decreased significantly ($P<0.05$). The volume of the kidney was significantly increased, and the surface was seriously granulated. Mesangial hyperplasia, dilation or atrophy of renal tubules, accompanied by large-area collagen deposition, could be found. Protein and mRNA expressions of TGF-β_1, Smad2, Smad3, ERK1 and ERK2 were increased significantly in renal tissue ($P<0.05$). Compared with model group, above indexes of Jinkui shenqi pills groups were all reversed significantly ($P<0.05$); dilation or atrophy of renal tubules was relieved, and collagen deposition was reduced to different extents. **CONCLUSIONS** Jinkui shenqi pills can improve renal function of RF model rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting TGF-β_1/Smads and TGF-β_1/ERK signaling pathway.

KEYWORDS　Jinkui shenqi pills; renal fibrosis; TGF-β_1/Smads signaling pathway; TGF-β_1/ERK signaling pathway; mechanism

肾纤维化（renal fibrosis，RF）是原发或继发慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）发展至终末期肾衰竭的共同病理途径，以肾小管萎缩、肾小球硬化为主要特征[1-2]。当肾脏组织受损后，肾间质会出现炎症细胞浸润，肾小管上皮细胞也会凋亡，而来源于肾小管上皮细胞-间充质转化（epithelial-mesenchymal transdifferentiation，EMT）的肌成纤维细胞将会聚集并使细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的生成与降解失衡，从而导致ECM过度沉积，进而引发RF[3-4]。西医治疗RF主要为对症治疗，即控制血压、血糖、血脂水平及抑制肾素-血管紧张素系统，以达到控制原发病和防治并发症的目的[5]，

Δ **基金项目** 河南省重点研发与推广专项（No.212102311132）

＊**第一作者** 高级实验师，硕士。研究方向：基础药理学。E-mail：zhangminghao@hactcm.edu.cn

但难以逆转RF过程。

中医学将CKD归属为“水肿、虚劳、癃闭、关格”范畴。CKD迁延日久，或失治误治，即进展成RF，故RF病机多为本虚标实——以脾肾虚损为本虚，以浊毒、湿热、瘀血为标实，故中医治疗当以补气、温阳、滋阴养血为主[6]。金匮肾气丸出自《金匮要略》，有“千古补肾之组方”之称，可调节机体免疫功能、清除氧自由基、抗氧化、抗纤维化，且效果显著[7]。考虑到金匮肾气丸补益肾气的作用符合RF的中医治疗思路，因此本研究选用金匮肾气丸对RF模型大鼠进行干预，以秋水仙碱为阳性对照药物，观察金匮肾气丸对RF模型大鼠肾功能、病理学形态及纤维化的影响。

相关研究发现，金匮肾气丸可通过抑制单侧输尿管梗阻（unilateral ureteral obstruction，UUO）模型大鼠α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）表达，改善肾功能；还可通过降低基质金属蛋白酶抑制剂的活性、升高基质金属蛋白酶的活性来减少肾间质胶原物质的沉积[8]，而基质金属蛋白酶系的活性调节均与转化生长因子β_1（transforming growth factor，TGF-β_1）有关。TGF-β_1是目前公认的致纤维化因子之一，可增加ECM合成并抑制其降解，使肾脏细胞与基质的黏附增加，从而导致肾脏固有细胞凋亡及炎症细胞浸润。TGF-β_1主要通过Smad依赖及非依赖的胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated protein kinases，ERK）通路这2个途径协同诱导RF过程[9]，而抑制TGF-β_1及其介导的信号通路就可以延缓甚至逆转RF过程。基于以上研究基础，考虑到中药具有作用于多靶点和通路的特点，本研究将通过TGF-β_1/Smads和TGF-β_1/ERK这2条信号通路来探讨金匮肾气丸对RF模型大鼠的干预作用及机制，以期为金匮肾气丸治疗RF提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有BS110S型电子天平（北京赛多利斯天平有限公司），MR-96TB型酶标仪[骋克仪器（上海）有限公司]，RM2235型石蜡切片机（德国Leica公司），D3024R型台式高速冷冻型微量离心机[大龙兴创实验仪器（北京）股份公司]，YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机（金华市科迪仪器设备有限公司），CX23型光学显微镜（日本Olympus公司），Stepone plus型荧光定量聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（美国ABI公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有金匮肾气丸（北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂，批号19032632，规格0.2 g/粒），秋水仙碱片（西双版纳版纳药业有限责任公司，批号190704，规格0.5 mg/片），羧甲基纤维素钠（CMC-Na，国药集团化学试剂有限公司，批号20160704），氨基甲酸乙酯（天津市光复科技发展有限公司，批号20210902），腺嘌呤、苏木素染色液、伊红染色液（福州飞净生物科技有限公司，批号分别为PH1779、190805、20211009），肌酐（creatinine，Cr）检测试剂盒、尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司，批号分别为C011-1-1、C013-1-1），兔SP试剂盒、DAB显色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号分别为SP-9001、ZLI-9018），兔抗大鼠TGF-β_1多克隆抗体、兔抗大鼠Smad2多克隆抗体、兔抗大鼠Smad3多克隆抗体、兔抗大鼠ERK1多克隆抗体、兔抗大鼠ERK2多克隆抗体（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号分别为GB11179、GB11511、GB111844、GB13003、GB11370-1）；其余试剂为实验室常用规格，水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为健康SD雄性大鼠，8周龄，体质量180～200 g，购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场，动物生产许可证号为SCXK（豫）2019-0002。实验期间动物饲养室环境温度为20～22 ℃，相对湿度为55%～60%，正常光照，大鼠自由饮水采食。本研究经河南中医药大学动物伦理委员会批准（批准号为DWLL20180018），实验过程及动物处置严格遵守“3R”原则。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

取雄性SD大鼠53只，适应性饲养1周后，按250 mg/kg灌胃腺嘌呤混悬液（以0.1% CMC-Na溶液溶解），每天1次，连续15 d；然后改为隔日1次，连续15 d。第31天随机取3只大鼠腹腔注射1 g/kg氨基甲酸乙酯麻醉，取腹主动脉血检测Cr、BUN水平，并剖取肾脏做常规病理检查。若大鼠血清中Cr、BUN水平升高，且显微镜下肾组织的纤维化及炎症细胞浸润明显，则提示RF模型构建成功[4]。将50只造模成功的大鼠按体质量随机分为模型组、秋水仙碱片组和金匮肾气丸低、中、高剂量组，每组10只；另取10只未造模大鼠作为正常组。金匮肾气丸、秋水仙碱片的人口服剂量分别为每天10 g、5 mg，经折算后，得金匮肾气丸、秋水仙碱片在大鼠中的用量分别为1 g/kg、0.45 mg/kg。基于此，本实验以折算剂量1 g/kg为金匮肾气丸中剂量；以0.5、2 g/kg（折算剂量的1/2、2倍）为金匮肾气丸低、高剂量；以0.45 mg/kg为秋水仙碱片剂量。以上药物均灌胃给药，灌胃体积为10 mL/kg；正常组和模型组大鼠灌胃等体积0.1% CMC-Na溶液，每天1次，连续30 d。

2.2 取材及处理

末次灌胃24 h后，各组大鼠称质量后腹腔注射1 g/kg氨基甲酸乙酯麻醉，取腹主动脉血，以3 000 r/min离心10 min，吸取上清液于－80 ℃条件下储存。剖取肾脏，去除肾脏周围结缔组织，以生理盐水洗涤，观察肾脏外观形态，用滤纸吸尽肾脏表面液体后使用电子天平称量；然后将肾脏组织一分为二，其中一份用4%多聚甲醛固定，另一份用液氮速冻后于－80 ℃条件下保存。

2.3 大鼠血清中Cr、BUN水平的检测

取“2.2”项下血清样品，采用分光光度法检测各组大鼠血清中Cr、BUN的水平，并计算BUN/Cr的比值以评价肾脏功能。

2.4 大鼠肾脏系数的检测

统计大鼠体质量与肾脏质量，计算肾脏系数（肾脏系数＝肾脏质量/体质量），以此来评价肾脏的病变程度。

2.5 大鼠肾脏组织的病理形态学观察

取4%多聚甲醛固定的肾脏组织适量，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片（厚度为4 μm）等过程制作病理切片。切片经二甲苯脱蜡后，一部分切片经苏木素-伊红（HE）染色，于光学显微镜下观察肾组织病理学变化。一部分切片（剩余部分用于后续相关蛋白表达水平的检测）经Masson染色（其中肌纤维呈红色，胶原纤维呈蓝绿色），于光学显微镜（×400）下随机选取1个视野，以蓝绿色为阳性染色，采用Image-Pro Plus 6.0软件测定每个视野下蓝绿色阳性面积与总面积，计算阳性面积百分比。

2.6 大鼠肾脏组织中TGF-β_1介导的Smads和ERK通路相关蛋白表达水平的检测

采用免疫组织化学法进行检测。取“2.5”项下石蜡切片经二甲苯脱蜡、水化后，以H_2O_2封闭，再以磷酸盐缓冲液清洗，柠檬酸盐缓冲液热修复8 min；滴加山羊血清封闭液，室温孵育30 min，倾去液体，分别滴加TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2一抗（稀释度均为1∶200），4 ℃孵育过夜；滴加生物素标记的羊抗兔二抗，37 ℃孵育20 min，DAB显色10 min，用自来水冲洗后，经苏木素复染3 min，用盐酸乙醇分化，并用自来水再次冲洗；切片经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后，采用光学显微镜进行观察。每只大鼠肾脏切片在光学显微镜（×400）下随机选取1个视野，以棕黄色为阳性染色，采用Image-Pro Plus 6.0软件测定每个视野中阳性染色区域的积分光密度（integrated optical density，IOD）值，用来反映目的蛋白的表达情况。

2.7 大鼠肾脏组织中TGF-β_1介导的Smads和ERK通路相关mRNA表达水平的检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。根据GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）已发表的大鼠*TGF-*β_1、*Smad*2、*Smad*3、*ERK*1、*ERK*2基因序列设计特异性引物（引物序列及扩增产物长度见表1），以上引物由武汉塞维尔生物科技有限公司合成。取肾脏组织100 mg，加入1 mL TriQuick试剂充分研磨匀浆后提取总RNA，检测RNA浓度及纯度。取总RNA适量，在20 μL反应体系中合成cDNA，再以2 μL cDNA为模板，加入靶基因的上、下游引物于15 μL反应体系中进行PCR扩增。反应结束后，根据扩增曲线及溶解曲线判断PCR反应的特异性。所得结果以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达水平。

表1 引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列	扩增产物长度/bp
TGF-β_1	上游：5′-GCTGAACCAAGGAGACGGAATA-3′	194
	下游：5′-GCAGGTGTTGAGCCCTTTCC-3′	
*Smad*2	上游：5′-GTTTGCCGAGTGCCTAAGTGATA-3′	258
	下游：5′-ACTGTCTGCCTCCGGTATTCTG-3′	
*Smad*3	上游：5′-CGAGAACACTAACTTCCCCGCT-3′	112
	下游：5′-GTGGTTCATCTGGTGGTCGCTA-3′	
*ERK*1	上游：5′-GAGAGATGTTTACATTGTTCAGGACC-3′	273
	下游：5′-GCCACATACTCGGTAAGAAAGC-3′	
*ERK*2	上游：5′-AACCTCCTGCTGAACACCACT-3′	111
	下游：5′-CGTGGCTACATACTCTGTCAAGAAC-3′	
GAPDH	上游：5′-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3′	138
	下游：5′-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3′	

2.8 统计学方法

数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析。实验结果满足正态分布以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验，检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠肾脏外观形态的观察结果

正常组大鼠肾脏形态完整，色泽红润且表面光滑。模型组大鼠肾脏体积明显增大，表面颗粒化严重，颜色灰白且缺血；剖开后可见肾内有大量积液潴留，肾皮质明显变薄，皮髓质界限不清晰。秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组大鼠肾脏表面色泽较模型组稍显红润，但仍呈缺血状态，表面颗粒化程度改善不明显（图略）。

3.2 大鼠血清中Cr、BUN水平及BUN/Cr比值的测定结果

与正常组比较，模型组大鼠血清中Cr、BUN水平均显著升高（$P<0.05$），BUN/Cr比值显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组大鼠血清中Cr、BUN水平均显著降低（$P<0.05$），BUN/Cr比值均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中Cr、BUN水平及BUN/Cr的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	Cr/（μmol/L）	BUN/（mmol/L）	BUN/Cr
正常组	240.49±33.38	39.35±4.88	40.82±8.68
模型组	646.59±75.37[a]	53.98±8.59[a]	20.59±3.78[a]
秋水仙碱片组	169.47±36.30[b]	45.31±2.62[b]	33.85±7.09[b]
金匮肾气丸低剂量组	313.98±61.35[b]	49.66±6.43[b]	35.75±7.31[b]
金匮肾气丸中剂量组	271.17±40.17[b]	39.58±5.73[b]	33.79±6.23[b]
金匮肾气丸高剂量组	261.68±19.78[b]	47.15±8.79[b]	44.70±8.54[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.3 大鼠肾脏系数的测定结果

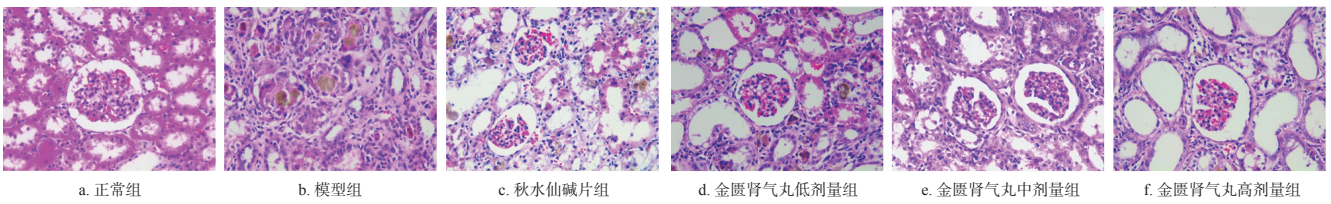
正常组、模型组、秋水仙碱片组和金匮肾气丸低、中、高剂量组大鼠肾脏系数分别为$(6.89\pm0.28)\times10^{-3}$、$(37.16\pm5.61)\times10^{-3}$、$(20.77\pm2.62)\times10^{-3}$、$(33.59\pm7.31)\times10^{-3}$、$(29.11\pm5.12)\times10^{-3}$、$(22.30\pm3.72)\times10^{-3}$。与正常组比较，模型组大鼠肾脏系数显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，秋水仙碱片组和金匮肾气丸中、高剂量组大鼠肾脏系数均显著降低（$P<0.05$）。

3.4 大鼠肾脏组织病理形态学的观察结果

HE染色结果显示，正常组大鼠肾小球形态规则，肾小管结构排列整齐，无系膜增生，间质正常，未见炎症细胞浸润；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，可见炎症细胞浸润；秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组大鼠肾小管扩张或萎缩较模型组减轻，炎症细胞减少，病变减轻。Masson染色结果显示，正常组大鼠肾脏组织仅有少量胶原蛋白沉积；模型组大鼠肾脏组织有大面积胶原蛋白沉积；秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组大鼠肾脏组织中胶原蛋白沉积较模型组均不同程度地减少。正常组、模型组、秋水仙碱片组和金匮肾气丸低、中、高剂量组大鼠肾脏组织Masson染色阳性面积百分比分别为（15.20 ± 0.71）%、（39.40 ± 0.83）%、（17.40 ± 0.43）%、（16.33 ± 0.93）%、（14.82 ± 0.86）%、（12.81 ± 0.58）%。与正常组比较，模型组大鼠肾脏组织Masson染色阳性面积百分比显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组该百分比则显著降低（$P<0.05$）。结果见图1。

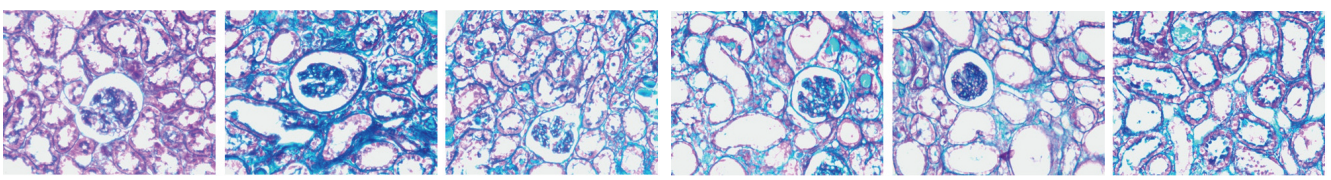
3.5 大鼠肾脏组织中TGF-β_1介导的Smads和ERK通路相关蛋白表达水平测定结果

正常组大鼠肾脏组织中有少量TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2蛋白表达；与正常组比较，模型组大鼠肾脏组织中有大量上述5种蛋白表达，其阳性表达的IOD值均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组大鼠肾脏组织中有少量上述5种蛋白表达，其阳性表达的IOD值显著降低（$P<0.05$）。结果见图2、表3。



a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

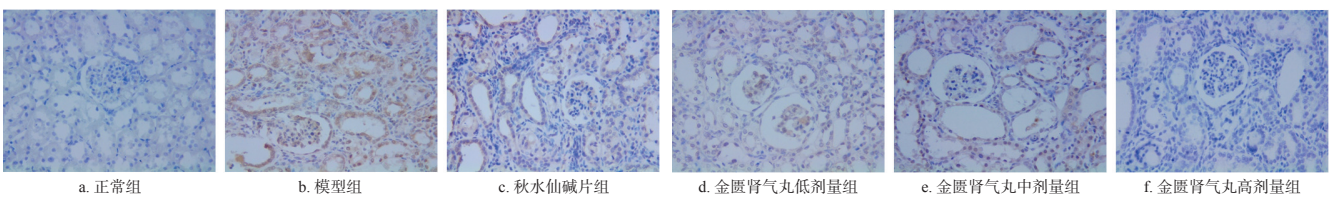
A. HE染色



a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

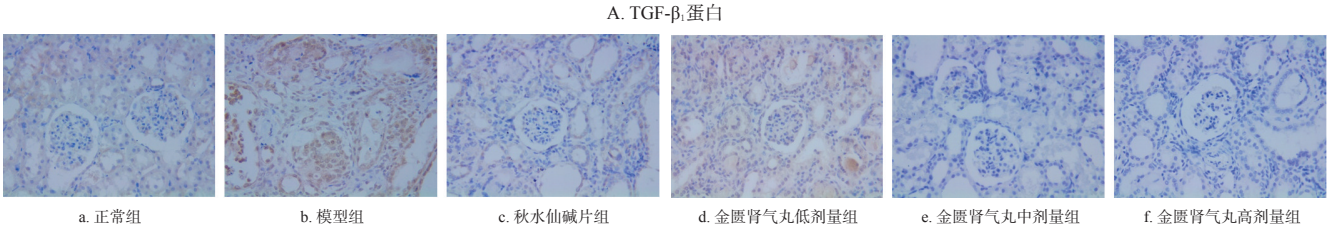
B. Masson染色

图1　各组大鼠肾脏组织的病理形态学显微图（×400）



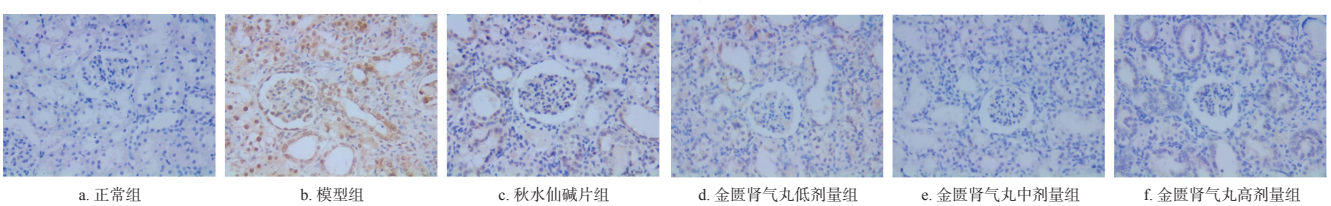
a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

A. TGF-β_1蛋白



a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

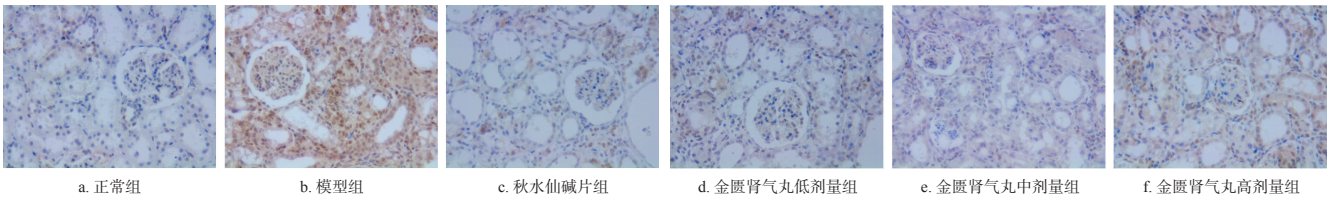
B. Smad2蛋白



a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

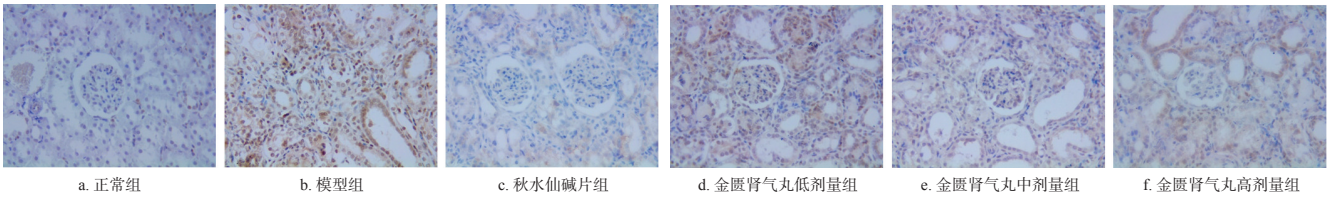
C. Smad3蛋白

图2　各组大鼠肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2蛋白表达的免疫组化显微图（×400）



a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

D. ERK1蛋白



a. 正常组　b. 模型组　c. 秋水仙碱片组　d. 金匮肾气丸低剂量组　e. 金匮肾气丸中剂量组　f. 金匮肾气丸高剂量组

E. ERK2蛋白

续图2

表3　各组大鼠肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2蛋白阳性染色的IOD值测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，$\times10^3$）

组别	TGF-β_1蛋白	Smad2蛋白	Smad3蛋白	ERK1蛋白	ERK2蛋白
正常组	187.06±2.10	164.50±3.35	105.35±2.76	155.48±2.03	107.38±2.21
模型组	485.23±2.42[a]	506.78±1.77[a]	454.64±2.92[a]	538.14±1.82[a]	335.40±2.61[a]
秋水仙碱片组	154.74±2.31[b]	126.33±0.74[b]	104.08±3.13[b]	103.63±1.66[b]	104.12±2.11[b]
金匮肾气丸低剂量组	276.92±1.40[b]	205.43±1.90[b]	225.33±2.10[b]	175.59±2.45[b]	155.08±2.44[b]
金匮肾气丸中剂量组	205.30±3.19[b]	195.03±2.80[b]	204.89±2.70[b]	176.95±2.52[b]	134.55±2.90[b]
金匮肾气丸高剂量组	144.25±2.23[b]	143.82±1.59[b]	104.91±2.88[b]	174.72±2.67[b]	146.46±2.28[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.6　大鼠肾脏组织中TGF-β_1介导的Smads和ERK通路相关mRNA表达水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，秋水仙碱片组和金匮肾气丸各剂量组大鼠肾脏组织中上述5种mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　各组大鼠肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2 mRNA表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	TGF-β_1/GAPDH	Smad2/GAPDH	Smad3/GAPDH	ERK1/GAPDH	ERK2/GAPDH
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	23.52±0.68[a]	33.15±1.79[a]	37.68±6.03[a]	8.51±2.35[a]	2.39±0.50[a]
秋水仙碱片组	13.23±2.90[b]	13.27±5.56[b]	11.14±4.00[b]	3.63±1.05[b]	1.23±0.12[b]
金匮肾气丸低剂量组	20.92±1.24[b]	29.37±0.82[b]	26.62±0.81[b]	6.49±0.27[b]	1.87±0.11[b]
金匮肾气丸中剂量组	15.71±2.68[b]	23.67±2.12[b]	22.97±1.68[b]	5.91±0.67[b]	1.53±0.22[b]
金匮肾气丸高剂量组	13.89±1.55[b]	23.68±1.90[b]	22.02±3.23[b]	5.59±0.36[b]	1.39±0.15[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

4　讨论

RF是CKD发展至终末期的最终表现，其动物模型可由药物、手术及转基因等方法诱导构建，以UUO模型和腺嘌呤诱导的模型最为经典[10]。UUO模型是采用手术方式结扎输尿管，引发尿潴留、肾肿大以及肾小管细胞坏死，从而导致肾功能丧失；该模型可模拟因尿路梗阻导致RF的进程，但病变往往只发生于结扎一侧，另一侧肾可弥补梗阻肾的功能[10]。腺嘌呤是嘌呤类含氮杂环化合物，可在黄嘌呤氧化酶的作用下代谢为2，8-二羟基腺嘌呤并积聚于肾小管，形成晶体堵塞肾小管，阻止氮质化合物排出，使血清中Cr、BUN、尿酸等指标的水平升高，大量过饱和的尿酸会在血液中结晶并沉积于肾小管、间质及肾小球部位，从而使肾脏局部发生肉芽肿性炎症和肾单位损伤，这一过程还与TGF-β密切相关[11]。故本实验采用腺嘌呤诱导构建大鼠RF模型。本研究结果发现，RF模型大鼠血清中Cr、BUN水平升高，BUN/Cr值降低，肾脏外表面颜色灰白且呈颗粒化，肾小管出现不同程度扩张或萎缩，间质增宽且纤维化组织增多，这表明造模成功。

RF是CKD患者肾功能丧失的主要原因，以激素、干扰素、血管紧张素酶抑制剂为主的西医治疗手段疗效有限，难以逆转RF进程。中医药或中西医结合治疗有望为延缓甚至逆转RF进展提供新的思路。中医理论认为，慢性肾衰与脾肾有关，该病早中期多见脾肾气虚，随着病情加重，会逐步出现肾虚气化失司、脾虚水湿不运，湿浊日久即生毒成瘀，浊毒蓄积而不能排出即成RF，故从“浊、毒、虚、瘀”论治乃中医治疗RF之根本[6]。金匮肾气丸是化气行水、温肾补阳的经典名方，方中地黄、山药、酒萸肉滋阴补肾，阴中补阳，健脾固肾益精；附子、桂枝温补阳气、引火归原；牛膝补肝肾，逐瘀通经；茯苓、泽泻、盐车前子利尿通淋、活血通络；牡丹皮清肝胆相火；诸药并用，可补益肾中真阴真阳，致肾气充盈，肾病消除[12]，故本实验选择金匮肾气丸为RF的干预药物加以研究。秋水仙碱是一种微管解聚剂，可以通过破坏细胞骨架完整性、抑制炎症细胞浸润、下调TGF-β等途径来发挥抗RF的作用[13]，故本实验选择秋水仙碱片为阳性对照药物。结果发现，金匮肾气丸能显著降低RF模型大鼠血清中Cr、BUN水平，改善肾组织纤维化病变程度，对RF模型大鼠具有较好的干预作用。

TGF-β是一种多肽类细胞因子，有TGF-β_1、TGF-β_2、TGF-β_3共3个亚型，所有亚型均含有7个Cys残基，其中6个Cys残基以链内二硫键连接数个β折叠片，以形成刚性结构；第7个Cys残基则与另一分子的Cys残基以链间二硫键形式连接，以构成具有生物活性的二聚体[14]。TGF-β在正常肾脏中几乎无表达，病变时则高表达于肾小球与肾小管细胞中，其中以TGF-β_1表达水平最高，可致ECM过度积聚，是RF形成过程中的关键调节因子[15]。Smad蛋白由氨基端的MH1结构域、羧基端的MH2结构域和富含脯氨酸的连接区组成，MH1与MH2这2个区域相互接触，使Smad分子呈现无活性的分子折叠状态；一旦被激活，Smad分子结构就会打开形成低聚体复合物，转移至核内参与转录调节[16]。TGF-β_1/Smads通路是丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路之一，通过受体偶联发挥作用，即TGF-β_1与细胞膜上受体TβRⅠ、TβRⅡ结合，形成TβRⅡ-TGF-β_1-TβRⅠ三聚体，TβRⅡ可使TβRⅠ磷酸化，磷酸化的TβRⅠ又可通过磷酸化方式激活Smad2和Smad3；活化后的Smad2/3与Smad4形成异聚体进入核内，调控靶基因转录，促进结缔组织生长因子和Ⅰ型、Ⅲ型胶原基因过量表达，进而诱导EMT发生，增加ECM积聚，抑制ECM降解，形成RF[9]。ERK是丝裂原活化蛋白激酶家族成员之一，有ERK1和ERK2共2个亚型。TGF-β_1/ERK通路是TGF-β_1介导RF的又一重要通路，上述提到的TβRⅡ-TGF-β_1-TβRⅠ三聚体经活化后可使ShcA蛋白磷酸化，触发生长因子受体结合蛋白2和SOS蛋白结合，激活Ras/ERK途径并使ERK1/2磷酸化，进而磷酸化多种底物蛋白，引起肾小管细胞胶原沉积，基底膜损伤，最终发生RF和肾小球硬化[17]。由TGF-β_1介导的Smad2/3和ERK1/2通路存在相互作用，共同调控细胞凋亡和EMT过程。这一相互作用主要体现在Smad2/3连接子区域存在ERK磷酸化位点，这一区域的磷酸化可延长Smad2/3的转录活性持续时间以及半衰期，ERK1/2抑制剂可阻断Smad2/3的磷酸化进程；此外，Ras/ERK途径还可扩大TGF-β_1反应，并与TGF-β_1协同诱导Smad依赖的Snail1表达，抑制E-钙黏蛋白的表达，促进EMT的进展[18]。本实验结果显示，与正常组比较，模型组大鼠肾脏组织中TGF-β_1、Smad2、Smad3、ERK1、ERK2蛋白及mRNA表达水平均显著升高，这提示TGF-β_1介导的TGF-β_1/Smads和TGF-β_1/ERK这2条通路均被激活。经金匮肾气丸干预后，大鼠肾脏组织中上述蛋白及mRNA表达水平均显著降低，表明金匮肾气丸可通过抑制TGF-β_1/Smads和TGF-β_1/ERK这2条通路来发挥抗RF作用。

综上所述，金匮肾气丸可改善RF模型大鼠的肾脏功能，其作用机制可能与抑制TGF-β_1/Smads和TGF-β_1/ERK这2条信号通路有关。

参考文献

[1] 杨梦凡，范桢亮，尹日平，等.肾小管间质纤维化发病机制的研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志，2021，22(2)：186-188.

[2] LIU Y P，SU Y Y，YANG Q，et al. Stem cells in the treatment of renal fibrosis：a review of preclinical and clinical studies of renal fibrosis pathogenesis[J]. Stem Cell Res Ther，2021，12(1)：333.

[3] 毛勇，应奇素，史长城，等.熊果酸调控TGF-β_1/Smads信号通路对肾纤维化的干预作用[J].中国现代应用药学，2021，38(24)：3149-3154.

[4] 张明昊，高一盈，赵盈盈，等.桃核承气汤对肾纤维化大鼠的保护作用机制研究[J].中国临床药理学杂志，2021，37(17)：2324-2327，2334.

[5] 孙倩，李姗姗，杨少宁，等.中医药调控Notch信号通路防治肾脏疾病研究进展[J].中国实验方剂学杂志，2021，27(24)：227-234.

[6] 孙亭如，姚源璋. 肾纤维化中西医治疗进展[J].中国中西医结合肾病杂志，2014，15(12)：1126-1128.

[7] 雷帆，孙虹，王卫华，等.金匮肾气丸和六味地黄丸对小鼠脑海马核团蛋白质组学作用的比较研究[J].中国中药杂志，2022，47(3)：701-712.

[8] 袁金凤，陈兰英，王慧玲，等.金匮肾气丸对腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠的影响[J].中国实验方剂学杂志，2018，24(21)：149-156.

[9] LI Q，MING Y，JIA H，et al. Poricoic acid A suppresses TGF-β_1-induced renal fibrosis and proliferation via the PDGF-C，Smad3 and MAPK pathways[J]. Exp Ther Med，2021，21(4)：289.

[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] ZHANG R，JIANG J Q，YU Y L，et al. Analysis of structural components of decellularized scaffolds in renal fibrosis[J]. Bioact Mater，2021，6(7)：2187-2197.

[12] 陆尤，陶睿，于书香. 温胆汤合金匮肾气丸加减治疗老年高血压病合并抑郁的临床疗效观察[J].中华中医药杂志，2021，36(8)：5101-5105.

[13] 黄文彦，陈荣华，郭梅，等.微管解聚剂秋水仙碱抗肾间质纤维化的研究[J].南京医科大学学报(自然科学版)，2002，22(4)：337-338.

[14] SU J，MORGANI S M，DAVID C J，et al. TGF-β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1[J]. Nature，2020，577(7791)：566-571.

（下转第1859页）