



· 药理 ·

# 黄芪当归合剂对间质纤维化肾脏中 细胞外基质降解系统的调控作用

孟立强<sup>1</sup>, 廖爱能<sup>2</sup>, 屈磊<sup>1</sup>, 唐嘉薇<sup>1</sup>, 李晓玫<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学第一医院, 北京大学肾脏疾病研究所 卫生部肾脏疾病重点实验室, 北京 100034;  
2. 福建省三明市第二医院, 福建 三明 366000)

**[摘要]** 目的:深入研究黄芪当归合剂抑制肾脏纤维化的作用机制。方法:Wistar 雄性大鼠随机分为假手术组、单侧输尿管梗阻模型组和黄芪当归合剂治疗组(14 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。在治疗后的第3,7,10天观察各组纤维化程度,测定纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及活性 PAI-1,t-PA 的表达,检测基质金属蛋白酶(MMP-9,MMP-2)及组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)活性。结果:黄芪当归合剂明显减轻输尿管梗阻导致的肾间质纤维化。在各时间点,模型组总 PAI-1 及活性 PAI-1 的表达较假手术组明显增高,而经黄芪当归合剂治疗后 PAI-1 表达及活性较模型组显著降低;模型组中 t-PA 仅在第3天时增高,同时黄芪当归合剂治疗组较模型组明显降低。整个观察期中模型组和黄芪当归合剂治疗组的 MMP-2,9 活性均较假手术组明显增高,但2组间无统计学差异;模型组的 TIMP-1 活性在第7天和第10天时显著增高,而黄芪当归合剂治疗组较模型组显著降低。结论:黄芪当归合剂可以改善肾组织 PAs/PAIs 及 MMPs/TIMPs 系统的失衡而减少细胞外基质的积聚,可能是其抑制肾间质纤维化的机制之一。

**[关键词]** 黄芪当归合剂;肾间质纤维化;细胞外基质;纤溶酶原激活物抑制物-1;组织型纤溶酶原激活物;基质金属蛋白酶;组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1

在慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)进展过程中,肾组织表现为逐渐加重的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)积聚所致的肾脏纤维化<sup>[1]</sup>。生理状态下机体维持着 ECM 合成和降解的动态平衡,在疾病状态下肌成纤维细胞过度分泌 ECM 以及组织降解 ECM 的能力异常导致 ECM 代谢的失衡而在组织中过度积聚<sup>[2]</sup>。参与 ECM 降解的纤溶系统和基质金属蛋白酶系统在肾脏疾病中的异常表达与 ECM 的代谢失调密切相关<sup>[3-7]</sup>,因此改善 ECM 降解系统的功能紊乱有助于减轻肾脏纤维化。

中药在慢性肾病的治疗中具有一定的作用<sup>[8-9]</sup>。研究表明,由黄芪和当归组方的黄芪当归合剂(A&A)通过抑制 ECM 的生成而减轻肾脏纤维化<sup>[10-11]</sup>。新近研究发现 A&A 能够抑制间质纤维化肾脏中纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1) mRNA 的表达<sup>[12]</sup>,提示

A&A 可能通过调控 ECM 降解,减轻肾脏纤维化,从而发挥肾脏保护作用。作者借助肾间质纤维化动物模型,观察 A&A 对肾组织中 PAI-1、组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator,t-PA)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)及组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase,TIMP-1)表达及活性的影响,明确 A&A 在 ECM 降解过程中的作用,进一步阐明 A&A 抑制肾脏纤维化的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,月龄 3 个月,体重(167±8)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2002-0003。

**1.2 药物制备** 黄芪购自山西省浑源县(编号 050702),经北京大学药学院蔡少青教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的根;当归购自甘肃省岷县(编号 050703),经蔡少青教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根,药材标本存放于北京大学药学院生药标本室。A&A 的制备方法和实验所用剂量均参照

[稿件编号] 20110713013

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30330710)

[通信作者] \* 李晓玫, Tel: (010) 83572388, E-mail: xiaomei0708@gmail.com



作者既往研究结果<sup>[10-12]</sup>,每毫升 A&A 水煎剂中相当于含生药黄芪和当归各 0.7 g。

**1.3 仪器及试剂** Lab Photo-2 双头显微镜(日本 Nikon 公司),Image-pro Plus 6.0 医学彩色图像分析系统(美国 Kodak 公司),EPS-301 电泳仪(美国 Amersham 公司),Model 550 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),大鼠纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(E0532r,武汉伊艾博科技有限公司),大鼠组织型纤溶酶原激活物(t-PA)ELISA 试剂盒(E0525r,伊艾博公司),大鼠活性 PAI-1 试剂盒(IRPAIKT,美国 Innovative Research 公司)和大鼠活性 t-PA 试剂盒(IRTPAKT,Innovative Research 公司)。实验所需化学试剂均为分析纯;病理标本制备及染色均由北京大学肾脏病研究所病理研究室协助完成。

## 2 方法

**2.1 动物模型的制备及标本收集** SPF 级动物饲养室内恒温(25±2)℃、恒湿(40%~60%)条件下饲养大鼠,给予鼠用全价营养颗粒饲料,自由饮水,每天照明 12 h。动物随机分为假手术组(sham 组)、单侧输尿管梗阻模型组(unilateral ureteral obstruction,UUO 组)和 UUO + A&A 治疗组(UAA 组),每组 24 只。按文献方法建立 UUO 模型<sup>[11-12]</sup>,2%戊巴比妥钠 40 mg·kg<sup>-1</sup>腹腔注射麻醉大鼠,结扎左侧输尿管,sham 组仅分离输尿管而不结扎。动物清醒 1 h 后灌胃给药;参照既往研究<sup>[11-12]</sup>,UAA 组给予 A&A 4 mL(相当于黄芪和当归生药各 14 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>);sham 组和 UUO 组给予去离子水 4 mL。试验过程中自由饮食。在给药后第 3,7,10 天,各组分别随机选取 8 只大鼠,戊巴比妥钠麻醉后,经腹主动脉尽量留取全部血液。切除左肾,冰生理盐水洗净,留取经肾门处的肾脏横断面组织,中性福尔马林固定,制备石蜡包埋的肾组织用于病理学分析;剩余肾组织迅速置液氮中保存备用。

**2.2 肾组织病理损伤程度** 肾组织标本行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)和过碘酸雪夫(periodic acid-Schiff,PAS)染色以观察肾组织病理特征。天狼星红染色观察肾组织胶原的表达情况来评估间质纤维化程度。肾组织石蜡切片脱蜡后,应用 1%天狼星红饱和苦味酸溶液染色 1 h,继而冰醋酸溶液脱色,胶原蛋白呈现出鲜红着色。每张切片随机选取互不重叠的 10 个视野(×200),天狼星红阳

性面积占整个视野面积的百分比作为纤维化指数(%),以反映肾组织的纤维化程度。

**2.3 肾组织中 PAI-1,t-PA 的浓度** 液氮中保存的肾组织加入适量预冷缓冲液低温研磨,离心,留取上清。应用考马斯亮蓝法测定肾组织匀浆中蛋白浓度。按 ELISA 试剂盒说明书测定 PAI-1 和 t-PA 浓度,在包被单抗的微孔中依次加入肾组织匀浆、生物素化的抗大鼠 PAI-1 或 t-PA 抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素,经彻底洗涤后用四甲基联苯胺显色。酶标仪在 450 nm 波长下测定吸收度,计算样品中 PAI-1 或 t-PA 的浓度。

**2.4 肾组织中活性 PAI-1,t-PA 的浓度** 应用 ELISA 法测定肾组织中活性 PAI-1 和 t-PA 的含量。肾组织匀浆中的活性 PAI-1 与微孔板上的尿激酶反应,然后相继加入抗 PAI-1 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗 IgG 抗体,测定 405 nm 波长下吸光度以计算活性 PAI-1 的含量。活性 t-PA 的测定与 PAI-1 相似,肾组织匀浆中的活性 t-PA 与微孔板上 PAI-1 反应,然后加入抗 t-PA 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗 IgG 抗体,测定 405 nm 波长下吸收度以计算活性 t-PA 的含量。

**2.5 肾组织中 MMPs 的活性** 应用明胶酶谱法检测体内 2 种 MMPs(MMP-2,MMP-9)活性。制备含有 0.1%明胶底物的 10%聚丙烯酰胺凝胶,60 μg 肾组织匀浆上样后电泳(浓缩胶 60 mA 恒流 150 min,分离胶 100 mA 恒流 240 min),2.5% Triton X-100 室温洗涤 15 min,共 2 次,再转移至含钙、锌及 1% Triton X-100 反应液中,37℃孵育 48 h,0.35%考马斯亮蓝(R-250)染色 60 min 共 2 次,脱色液脱色,直至蓝色背景下可见无色清晰透明条带。半定量分析明胶酶消化条带吸收度以检测 MMP-2 及 MMP-9 的活性。各组 MMPs 的活性应用肾组织匀浆蛋白浓度校正,并以同批检测的同一时间点 sham 组的倍数表示。

**2.6 肾组织中 TIMP-1 的活性** 应用逆明胶酶谱法检测肾组织中 TIMP-1 活性。试验方法及条件与上述明胶酶谱法类似,主要区别是配制分离胶时需加入适量 MMP-9,MMP-2 蛋白标准品,并且在 4℃下电泳。室温洗涤后,反应液中 37℃孵育 48 h。0.35%考马斯亮蓝染色 60 min,共 2 次,脱色液脱色,直至无色清晰透明背景下可见蓝色条带,半定量分析条带吸收度以检测 TIMP-1 的相对活性。各

组 TIMP-1 的活性应用肾组织匀浆蛋白浓度校正,并以同批检测的同一时间点 sham 组的倍数表示。

**2.7 统计学分析** 数据资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 14.0 统计软件进行分析,各组间的数据比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验,  $P < 0.05$  时为差异有显著性。

### 3 结果

#### 3.1 各组大鼠肾小管/间质病理特征及胶原的表达

HE, PAS 染色结果显示,与 sham 组相比,UUO 组大鼠出现肾间质水肿、间质单个核细胞浸润,肾小管扩张或萎缩,以及间质纤维化;UAA 组肾脏病理损伤程度明显较 UUO 组减轻。天狼星红染色显示肾间质胶原表达情况见图 1,在模型制备后的第 10 天,sham 组的肾间质中有轻微胶原表达,而 UUO 组的肾间质中总胶原表达量明显增高[UUO 组  $(9.4 \pm 1.6)\%$ ,sham 组  $(1.3 \pm 0.2)\%$ ,  $P < 0.05$ ];UAA 组的总胶原的表达量明显减少 [ $(5.2 \pm 0.8)\%$ ,与 UUO 组相比  $P < 0.05$ ]。

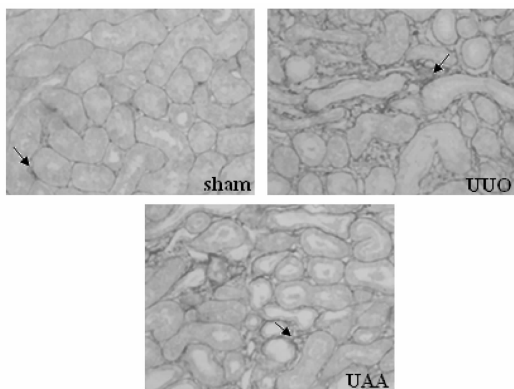


图 1 各组大鼠肾组织中胶原的表达(天狼星红染色,  $\times 200$ )

Fig. 1 Expression of collagen in interstitium in groups (sirius red staining,  $\times 200$ )

#### 3.2 A&A 对 UUO 大鼠肾组织总 PAI-1, t-PA 表达的影响

在整个观察期内,sham 组的肾组织中总 PAI-1 和 t-PA 的表达较为稳定。但是在模型建立后第 3,7,10 天,UUO 组 PAI-1 的表达均较 sham 组明显升高( $P < 0.05$ ),而 UAA 组 PAI-1 的表达在各个时间点均较 UUO 组显著降低( $P < 0.05$ )。UUO 组 t-PA 的表达仅在第 3 天时较 sham 组升高( $P < 0.05$ ),在同一时间点上,UAA 组 t-PA 的表达较 UUO 组显著降低( $P < 0.05$ ),见表 1,2。

表 1 各组大鼠肾组织 PAI-1 的表达量( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天
sham	156.5 $\pm$ 14.1	145.3 $\pm$ 10.0	138.6 $\pm$ 32.8
UUO	254.5 $\pm$ 10.5 <sup>1)</sup>	277.5 $\pm$ 30.9 <sup>1)</sup>	293.5 $\pm$ 35.5 <sup>1)</sup>
UAA	143.4 $\pm$ 42.2 <sup>2)</sup>	156.9 $\pm$ 19.0 <sup>2)</sup>	152.0 $\pm$ 18.5 <sup>2)</sup>

注:与 sham 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 UUO 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ (表 2, 3,图 3 同)。

表 2 各组大鼠肾组织 t-PA 的表达量( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天
sham	30.1 $\pm$ 17.3	41.7 $\pm$ 12.6	23.0 $\pm$ 9.1
UUO	58.1 $\pm$ 16.5 <sup>1)</sup>	32.8 $\pm$ 21.4	35.1 $\pm$ 13.6
UAA	26.3 $\pm$ 8.7 <sup>2)</sup>	16.9 $\pm$ 9.3	27.1 $\pm$ 13.1

在整个观察期内,sham 组的肾组织中活性 PAI-1 的表达极其微弱。在 UUO 组中,活性 PAI-1 的表达明显增高( $P < 0.05$ )。在第 7,10 天时 UAA 组活性 PAI-1 的表达显著低于 UUO 组( $P < 0.05$ )。但是,肾组织中活性 t-PA 在 3 组中无显著差异(数据未列出),见表 3。

表 3 各组动物肾组织中活性 PAI-1 的表达( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天
sham	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.5
UUO	30.5 $\pm$ 23.8	36.5 $\pm$ 11.2 <sup>1)</sup>	54.5 $\pm$ 14.2 <sup>1)</sup>
UAA	9.5 $\pm$ 1.0	14.9 $\pm$ 0.5 <sup>2)</sup>	15.4 $\pm$ 4.8 <sup>2)</sup>

#### 3.3 A&A 对 UUO 大鼠肾组织 MMP-2, MMP-9 活性的影响

观察期内,sham 组的 MMP-2, MMP-9 活性均较为稳定;而在 UUO 组中,各时间点的 MMP-2, MMP-9 活性均较 sham 组明显增高( $P < 0.05$ )。与 UUO 组相比,UAA 组的 MMP-2, MMP-9 活性无显著变化,见图 2。

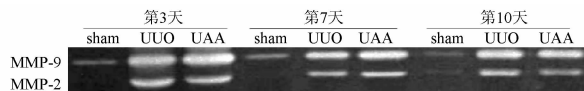


图 2 各组大鼠肾组织中 MMP-9 和 MMP-2 的活性

Fig. 2 Activity of MMP-9 and MMP-2 in interstitium in groups



### 3.4 A&A对UO大鼠肾组织TIMP-1活性的影响

sham组的TIMP-1活性在各时间点均相对稳定。在第3天和第7天时,UO组TIMP-1的活性与sham组相比无明显差异,但在第10天时显著增高( $P < 0.05$ )。虽然TIMP-1活性在第3天时各组间无明显差异;但与UO组相比,UAA组的TIMP-1活性在第7天和第10天时均显著降低( $P < 0.05$ ),见图3。

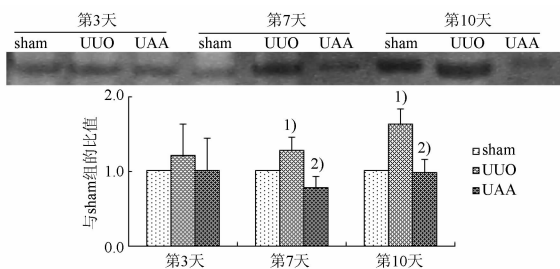


图3 各组大鼠肾组织中TIMP-1的活性

Fig. 3 Activity of TIMP-1 in interstitium in groups

## 4 讨论

持续加重的肾脏纤维化是导致CKD不断进展和肾功能进行性下降的主要病理基础<sup>[1]</sup>。肾脏纤维化不仅是由于ECM的过度分泌,而且还与组织降解ECM的能力异常有关<sup>[2]</sup>;ECM合成与降解的失衡导致ECM的持续积聚而致纤维化。因此,调控ECM的合成与降解有助于抑制肾脏纤维化和改善CKD预后。既往的研究表明,A&A通过多种机制抑制ECM的合成和改善肾脏功能,包括抑制转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )表达和肾小管上皮细胞转分化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT)、减轻肾间质炎症反应,促进一氧化氮和内皮细胞生成因子的合成、减少微血管丢失而改善肾组织局部缺血、缺氧状态等<sup>[10-11,13-14]</sup>。通过本研究,发现在肾间质纤维化进展中的多个时间点上,A&A不同程度地抑制了肾组织中PAI-1,t-PA及TIMP-1的表达和/或活性,提示A&A还可能通过改善ECM降解系统的异常而抑制肾间质纤维化的进展。

生理状态下,纤溶系统和基质金属蛋白酶系统是参与ECM降解的重要酶类。纤溶酶原经PAs催化生成纤溶酶,直接降解ECM;PAs的活性受到PAIs的调控,其中PAI-1作用最强,是调节纤溶酶生

成的重要物质<sup>[5]</sup>。MMPs是体内最重要的ECM降解酶类,并受TIMPs的调控<sup>[4]</sup>。而纤溶酶同时又是MMPs的激活剂,两大系统协同作用,共同精细调控组织中ECM的代谢。

但在CKD进展过程中,肾组织呈现PAs/PAIs与MMPs/TIMPs的异常表达<sup>[15-17]</sup>,提示肾脏局部ECM降解系统的异常参与了纤维化的发生及进展。研究表明PAI-1通过招募巨噬细胞、活化肌成纤维细胞及降低尿激酶活性等途径,促进了间质纤维化;而在PAI-1基因敲除或缺陷动物中肾间质纤维化程度及组织中TGF- $\beta$ 水平明显降低<sup>[5,18]</sup>,抑制PAI-1的表达或活性同样可减轻间质纤维化<sup>[19-20]</sup>。由此可见,PAI-1促进间质纤维化的作用并非完全与抑制纤溶有关,而是通过促进炎细胞浸润及增加TGF表达等多种机制实现的。纤溶系统中的其他成分也与纤维化进展有关,如t-PA通过促进肌成纤维细胞活化并抑制其凋亡而增加ECM的生成<sup>[21]</sup>;纤溶酶通过促进白细胞浸润、活化TGF- $\beta$ 、活化MMP使肾小管基底膜断裂而促进EMT发生等机制加重间质纤维化<sup>[22-24]</sup>。本研究中梗阻侧肾脏中PAI-1和t-PA明显增高,进一步证实纤溶系统的异常促进了间质纤维化。A&A作用于纤溶系统的多个环节,不仅抑制t-PA的表达,更重要的是在观察期的各个时间点均显著抑制了PAI-1的表达及活性,这可能是A&A抑制间质纤维化的作用靶点之一。

此外,文献报道MMPs的2种主要亚型MMP-2和MMP-9可以破坏肾小管上皮基底膜的完整,诱导肾小管上皮细胞的迁移及表型转化<sup>[25-26]</sup>,从而促进纤维化。而肾脏中广泛表达的TIMP-1则可通过上调细胞间黏附因子-1的表达,加重肾脏局部炎症病变而促进间质纤维化的进展<sup>[7]</sup>。因此,在间质纤维化过程中,MMP/TIMP活性的异常增高反而通过诱导EMT和炎症反应而促进病变的进展。本研究中UO组中MMP-2,9活性及TIMP-1的活性均明显增高;虽然未发现A&A对MMP-2,9的活性有明显作用,但在造模后的第7天和第10天,A&A均可显著降低TIMP-1的活性。提示A&A通过调控MMP/TIMP的异常,减轻炎症反应而起到抑制纤维化的作用。

通过本研究,进一步证实间质纤维化是一个极其复杂的病理生理过程;促进ECM降解的纤溶系统和金属基质蛋白酶系统也并非单纯起到减少ECM积



聚的作用。在肾间质纤维化的进展过程中,由于促纤维化、抗纤维增生和纤溶作用的平衡失调,两大ECM降解系统的净效应是促进了疾病的进展<sup>[27]</sup>。结合既往研究结果表明,A&A不仅能够通过多种机制抑制ECM的合成,而且还可以通过不同的作用靶点改善肾组织中PA<sub>s</sub>/PAI<sub>s</sub>及MMP<sub>s</sub>/TIMP<sub>s</sub>系统的失衡,减少ECM的积聚,从而减轻间质纤维化。

#### [参考文献]

- [1] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2):213.
- [2] Pozzi A, Voziyan P A, Hudson B G, et al. Regulation of matrix synthesis, remodeling and accumulation in glomerulosclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(12):1318.
- [3] Eddy A A. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(4):656.
- [4] Catania J M, Chen G, Parrish A R. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(3):F905.
- [5] Matsuo S, López-Guisa J M, Cai X, et al. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice[J]. *Kidney Int*, 2005, 67(6):2221.
- [6] Hu K, Lin L, Tan X, et al. tPA protects renal interstitial fibroblasts and myofibroblasts from apoptosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(3):503.
- [7] Cai G, Zhang X, Hong Q, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 exacerbated renal interstitial fibrosis through enhancing inflammation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(6):1861.
- [8] 冯青, 万毅刚, 蒋春明, 等. 中药延缓慢性肾功能衰竭进展的机制和效果[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(9):1122.
- [9] Li X, Wang H. Chinese herbal medicine in the treatment of chronic kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2005, 12(3):276.
- [10] Wang H, Li J, Yu L, et al. Antifibrotic effect of the Chinese herbs, *Astragalus mongholicus* and *Angelica sinensis*, in a rat model of chronic puromycin aminonucleoside nephrosis[J]. *Life Sci*, 2004, 74(13):1645.
- [11] 孟立强, 屈磊, 李晓玫. 黄芪当归合剂对肾间质纤维化的多靶点抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(3):296.
- [12] Meng L, Van Putten V, Qu L, et al. Altered expression of genes profiles modulated by a combination of *Astragalus Radix* and *Angelica Sinensis Radix* in obstructed rat kidney[J]. *Planta Med*, 2010, 76(13):1431.
- [13] Song J, Meng L, Li S, et al. A combination of Chinese herbs, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Angelica sinensis*, improved renal microvascular insufficiency in 5/6 nephrectomized rats[J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 50(5/6):185.
- [14] Meng L, Qu L, Tang J, et al. A combination of Chinese herbs, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Angelica sinensis*, enhanced nitric oxide production in obstructed rat kidney[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(2/3):174.
- [15] Ishidoya S, Ogata Y, Fukuzaki A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are up-regulated during unilateral ureteral obstruction in adult rats[J]. *J Urol*, 2002, 167(3):1503.
- [16] Ogata Y, Ishidoya S, Fukuzaki A, et al. Upregulated expression of transforming growth factor-beta, type IV collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA are decreased after release of unilateral ureteral obstruction[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2002, 197(3):159.
- [17] Yang J, Shultz R W, Mars W M, et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(10):1525.
- [18] Krag S, Danielsen C C, Carmeliet P, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene deficiency attenuates TGF-beta1-induced kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(6):2651.
- [19] 成小苗, 周巧玲, 林书典, 等. 自发性高血压大鼠 Klotho 与 MMP-9, TIMP-1 和 PAI-1 基因的表达及福辛普利和缬沙坦对其的干预作用[J]. *中南大学学报:医学版*, 2010, 35(10):1048.
- [20] Gonzalez J, Klein J, Chauhan S D, et al. Delayed treatment with plasminogen activator inhibitor-1 decoys reduces tubulointerstitial fibrosis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234(12):1511.
- [21] Hu K, Wu C, Mars W M, et al. Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12):3821.
- [22] Ploplis V A, French E L, Carmeliet P, et al. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice[J]. *Blood*, 1998, 91(6):2005.
- [23] Munger J S, Harpel J G, Gleizes P E, et al. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5):1376.
- [24] Zhang G, Kernan K A, Collins S J, et al. Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(3):846.
- [25] Wang X, Zhou Y, Tan R, et al. Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(5):F973.
- [26] Aresu L, Benali S, Garbisa S, et al. Matrix metalloproteinases and their role in the renal epithelial mesenchymal transition[J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(3):307.
- [27] Zheng G, Harris D C. Plasmin in renal interstitial fibrosis: innocent or guilty[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(1):455.



## Modulation of aberrant extracellular matrix degradation systems by Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix decoction (A&A) in interstitial fibrotic kidney

MENG Liqiang<sup>1</sup>, LIAO Aineng<sup>2</sup>, QU Lei<sup>1</sup>, TANG Jiawei<sup>1</sup>, LI Xiaomei<sup>1\*</sup>

(1. First Hospital of Peking University; Peking University, Institute of Nephrology;  
Key Laboratory of Renal Disease, Ministry of Health of China, Beijing 100034, China;  
2. Second Hospital of Sanming City, Sanming 366000, China)

**[Abstract]** **Objective:** The imbalance between extracellular matrix (ECM) synthesis and degradation induces the excessive ECM deposition and thus renal fibrosis. The decoction (A&A) which is a combination of two Chinese herbs, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Angelica sinensis*, has been shown to alleviate ECM production in animal models of chronic kidney diseases. In this paper, the effect of A&A on ECM degradation was investigated with interstitial fibrosis in rats. **Method:** Male Wistar rats were randomly divided into sham, unilateral ureteral obstruction (UUO) and UAA (UUO plus A&A administration) groups. After administration of A&A ( $14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) by gavage for 3, 7 and 10 days, morphological changes were evaluated by HE, PAS and Sirius red staining technique. The expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue-type plasminogen activator (t-PA), the activity of PAI-1 and t-PA were determined by ELISA. The activity of matrix metalloproteinases (MMP-9, MMP-2), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) were evaluated by gelatin zymography or reverse gelatin zymography, respectively. **Result:** Morphological analysis showed severe interstitial mononuclear cells infiltration, tubular atrophy, renal fibrosis and collagen expression in kidneys of UUO group, which was reduced by A&A administration ( $P < 0.05$ , UAA vs UUO group). Compared with the sham group, the expression of PAI-1 was significantly increased in UUO group by 63%, 91% and 112% at day 3, 7 and 10 respectively; and there were a remarkable decrease in UAA group by 44%, 43% and 52% at day 3, 7 and 10. The expression of active PAI-1 was strikingly increased in UUO group at day 3 [ $(30.5 \pm 23.8) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(0.0 \pm 0.0) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ], day 7 [ $(36.5 \pm 11.2) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(0.0 \pm 0.0) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ], and day 10 [ $(54.5 \pm 14.2) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(0.5 \pm 0.5) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ]. The active PAI-1 was decreased in UAA group at day 7 [ $(14.9 \pm 0.5) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(36.5 \pm 11.2) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ] and day 10 [ $(15.4 \pm 4.8) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(54.5 \pm 14.2) \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ]. The expression of t-PA was increased in UUO group only at day 3 [ $(58.1 \pm 16.5) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(30.1 \pm 17.3) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ],  $P < 0.05$ , meanwhile decreased in UAA group [ $(26.3 \pm 8.7) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  vs.  $(58.1 \pm 16.5) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ]. But the expression of active t-PA was shown no significantly difference among the three groups. For MMP-2 and MMP-9 activity, they were significantly higher compared with the sham group in UUO group, but no significantly change after A&A treatment. The TIMP-1 activity was significantly increased in UUO group by 28% and 63% at day 7 and 10 respectively, significantly decreased in UAA group by 40% and 39% at the same time point. **Conclusion:** The anti-fibrosis effects of A&A might be associated with modulating the imbalance of PAs/PAIs system as well as MMPs/TIMPs system, thereby alleviate ECM accumulation and interstitial fibrosis.

**[Key words]** Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix decoction; renal tubulointerstitial fibrosis; extracellular matrix; plasminogen activator inhibitor-1; tissue-type plasminogen activator; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase-1

doi:10.4268/cjmm20120117

[责任编辑 张宁宁]