

• 基础医学论著/研究 •

抗纤灵对慢性肾衰竭小鼠心脏 TGF- β_1 /Smad 通路的影响



夏 嘉^{1,2}, 王 颖¹, 高雅婵¹, 袁杭海¹, 何立群¹

摘要:目的 观察抗纤灵对 5/6 肾切除小鼠诱导的慢性肾衰竭心脏转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、Smad3、Smad7 mRNA 表达的影响, 从心脏 TGF- β_1 /Smad 信号通路的角度探讨抗纤灵治疗慢性肾衰竭心脏病变的作用机制。方法 按 Platt 法建立慢性肾衰竭小鼠模型, 造模成功后, 随机将手术组小鼠分为模型组、缬沙坦组、抗纤灵组, 每组 9 只。抗纤灵组予抗纤灵方煎剂 0.5 mL 灌胃, 药物浓度为 20 g/kg, 每日 1 次; 缬沙坦组予缬沙坦 0.5 mL 灌胃, 药物浓度为 20 mg/kg, 每日 1 次; 模型组和假手术组均予等量蒸馏水灌胃, 连续灌胃 22 周。22 周后计算各组小鼠心脏胶原面积, 用 real-timePCR 法检测 TGF- β_1 、Smad3、Smad7 mRNA 的表达。结果 与假手术组比较, 模型组的心脏胶原面积、TGF- β_1 及 Smad3 mRNA 显著增高 ($P < 0.01$), Smad7 mRNA 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 抗纤灵组的 Smad3 mRNA 有改善 ($P < 0.05$), 心脏胶原面积、TGF- β_1 mRNA、Smad7 mRNA 有显著改善 ($P < 0.01$); 缬沙坦组的心脏胶原面积、TGF- β_1 mRNA、Smad7 mRNA 明显改善 ($P < 0.01$), Smad3 mRNA 有改善 ($P < 0.05$)。抗纤灵组与缬沙坦组组间比较, 在改善心脏胶原面积、降低 TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA 的表达及升高 Smad7 mRNA 的表达方面差异无统计学意义。结论 抗纤灵能通过调节 TGF- β_1 /Smad 信号通路改善慢性肾衰竭引起的心脏病变。

关键词:慢性肾衰竭; 抗纤灵; 心脏; TGF- β_1 /Smad 通路

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2019.03.010

Effect of Kangxianling on TGF- β_1 /Smad Pathway in the Hearts of Mice with Chronic Renal Failure

XIA Jia, WANG Ying, GAO Yachan, YUAN Hanghai, HE Liqun

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medical, Shanghai 210029, China; Shanghai Chinese Medicine Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China

Corresponding Author: HE Liqun (Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China)

Abstract: Objective To determine the effect of Kangxianling decoction (KXLD) on the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)/Smad signaling pathway in the hearts of 5/6 nephrectomized mice model, and discuss its mechanism. **Methods** C57BL/6 male mice were performed 5/6 nephrectomization to create chronic renal failure. After the models were established, mice were randomly divided into model group, KXLD group, and Valsartan group ($n = 9$). The mice in KXLD group and Valsartan group were administered with KXLD 20 g/kg, and Valsartan 20 mg/kg, 0.5 mL/d, respectively. The mice in model group and sham-operated groups were given 0.5 mL water. The mice were sacrificed after 22 weeks of treatment, cardiac collagen areas were examined, the levels of TGF- β_1 , Smad3 and Smad7 mRNA expression were observed by real-time PCR method. **Results** Compared with sham group, cardiac collagen areas, TGF- β_1 , Smad3 mRNA were significantly increased ($P < 0.01$) and Smad7 mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with model group, Smad3 mRNA was improved ($P < 0.05$), and cardiac collagen areas, TGF- β_1 and Smad7 mRNA were attenuated significantly ($P < 0.01$) in the KXLD group. Compared with model group, Smad3 mRNA was improved ($P < 0.05$), while cardiac collagen areas, TGF- β_1 , Smad7 mRNA were attenuated significantly ($P < 0.01$) in the Valsartan group. There was no difference between valsartan group and KXLD group. **Conclusion** KXLD can protect heart function via TGF- β_1 /Smad signaling pathway.

Keywords: chronic renal failure; Kangxianling decoction; heart; transforming growth factor- β_1 /Smad pathway

基金项目 上海市名老中医学术经验研究工作室 (No.SHGZS-2017027)

作者单位 1. 上海中医药大学附属曙光医院 (上海 210029); 2. 上海中医药大学附属市中医医院

通讯作者 何立群, E-mail: haligun59@163.com

引用信息 夏嘉, 王颖, 高雅婵, 等. 抗纤灵对慢性肾衰竭小鼠心脏 TGF- β_1 /Smad 通路的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(3): 361-364.

慢性肾衰竭(CRF)是所有的慢性肾脏疾病(CKD)发展的最终结局,从病理上讲,包括肾小球及肾血管的硬化和肾间质纤维化。近年来,慢性肾衰竭的发病率正呈现逐年升高趋势,而心血管疾病占慢性肾衰竭病人死亡原因的50%以上^[1],心血管疾病病理上的突出表现为左心室肥厚、冠状动脉粥样硬化等^[2]。因此,如何积极控制并延缓肾衰竭的进展和改善心血管并发症成为国内外学者关注的焦点。虽然血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂在这方面有一定的作用,但对于肾功能进行性恶化和终末期肾衰竭病人的应用受到了限制。本研究拟观察抗纤灵对慢性肾衰竭小鼠心脏转移生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad通路的影响,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级8周龄C57BL/6小鼠,购自北京维通利华实验动物有限公司,由上海中医药大学实验动物中心分笼饲养,自由进食、饮水。

1.1.2 药物与试剂 抗纤灵组方:桃仁12g,丹参15g,当归12g,酒大黄9g,怀牛膝15g。由曙光医院中药房提供,煎煮20~25min。缬沙坦胶囊(每粒80mg),北京诺华制药有限公司。Trizol Reagent总RNA抽提试剂盒购自美国Invitrogen公司,实时荧光定量试剂盒及逆转录试剂盒购自日本TaKara公司,Masson染色试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.1.3 仪器 石蜡切片机(德国LEICA公司)、冷冻高速离心机(德国Eppendorf公司)、显微镜及成像系统(麦克奥迪实业集团有限公司)、ViiA 7型实时定量PCR仪(美国ABI公司生产)。

1.2 方法 按Platt法建立慢性肾衰竭小鼠模型:小鼠适应性饲养1周后随机将小鼠分为假手术组(8只)和手术组(27只),以2%戊巴比妥钠0.07~0.08mL进行小鼠腹腔注射,小鼠麻醉后取右侧卧位充分暴露左肾区,沿左肋脊下缘1.5cm处消毒做斜向切开皮肤及肌层,在腹膜后取出左肾,剥离周围组织及肾包膜,再做弧形切口主要切除肾皮质,明胶海绵止血,缝合肌层及皮肤。7d后再进行右肾全切除。假手术组只剥离左右肾包膜,术后2周眼眶采血测血肌酐,观察模型是否成功。

造模成功后,随机将手术组小鼠分为模型组(9只)、缬沙坦组(9只)、抗纤灵组(9只)。抗纤灵组予抗纤灵方煎剂0.5mL灌胃,药物浓度为20g/kg,每日1次;缬沙坦组予缬沙坦0.5mL灌胃,药物浓度为20

mg/kg,每日1次;模型组和假手术组均予等量蒸馏水灌胃,连续灌胃22周。实验终点时,模型组及抗纤灵组各剩6只,缬沙坦组、假手术组剩7只。

1.3 取材 各组小鼠眼球摘除取血后,迅速剪开胸廓,取心脏,生理盐水洗净,吸干多余水分,剪取一部分左心室放入4%多聚甲醛中行Masson染色并计算胶原面积;剩余部分心脏放入冷存管,存放于-80℃冰箱备用。

1.4 心脏胶原面积的比较 Masson染色示小鼠的心肌纤维呈紫红色,胶原纤维呈蓝色。每张切片随机选取4个高倍视野,用Image Pro6图像分析软件进行分析,比较每组心脏胶原面积占整个视野的百分比。

1.5 小鼠心脏组织TGF- β_1 、Smad3、Smad7mRNA的表达 从-80℃冰箱中取出小鼠心脏组织,根据Trizol说明书进行RNA的抽提,用紫外分析测定所需提取2 μ g的RNA体积,加DEPC水补足体积至8 μ L。在PCR管中依次加入:5 \times RT buffer 0.8 μ L,Inhibitor 0.4 μ L,10mmol/L dNTP mix 0.4 μ L,Transcriptase 0.4 μ L,使最终体积为10 μ L。在PCR体系中依次加入(冰上操作):梯度稀释标准品或RT产物1 μ L,SYBR premix ex taq 10 μ L,RT Primer Mix 1 μ L,RNase Free dH₂O 7.6 μ L,RoxII 0.4 μ L,总体积20 μ L。用荧光定量专用的PCR封口膜覆盖96孔PCR板,瞬时离心后放入荧光定量PCR仪内,设定反应条件:95℃15s预变性,95℃5s变性,60℃30s退火,40个循环。根据溶解曲线判断PCR反应的特异性。引物信息:TGF- β_1 上游CCACCTGCAAGACCATCGAC,下游CTG-GCGAGCCTTAGTTTGGAC,产物长度91;Smad3上游ACTAACTTCCCTGCTGGCAT,下游ACTGGCTGTAGGTCCAAGT,产物长度183;SMAD7上游CTCT-GTGAAGTAGAGTCTCCCC下游GCTCCAGAAGAAGTT-GGGAATC,产物长度163。以GAPDH为内参。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计学处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠心脏胶原面积的影响 与假手术组比较,模型组的小鼠心脏胶原面积显著增大($P < 0.01$),抗纤灵组和缬沙坦组与模型组比较,心脏胶原面积显著缩小($P < 0.01$),且抗纤灵组与缬沙坦组组间比较无统计学意义。详见表1。

表 1 各组小鼠心脏胶原面积的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	胶原面积(%)
假手术组	7	2.52±0.93
模型组	6	31.10±5.12 ¹⁾
抗纤灵组	6	19.57±1.93 ²⁾
缬沙坦组	7	18.90±1.59 ²⁾

与假手术组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,2) $P < 0.01$

2.2 对小鼠心脏组织 TGF- β_1 、Smad3、Smad7 mRNA 表达水平的影响 模型组 TGF- β_1 、Smad3 mRNA 与假手术组比较显著升高($P < 0.01$),模型组 Smad7 mRNA 与假手术组比较显著降低($P < 0.01$)。治疗后与模型组比较,抗纤灵组及缬沙坦组能显著降低 TGF- β_1 mRNA 的表达($P < 0.01$),降低 Smad3 mRNA 的表达($P < 0.05$),抗纤灵组与缬沙坦组比较无统计学意义($P > 0.05$)。经治疗,抗纤灵组及缬沙坦组 Smad7 mRNA 与模型组比较有显著上升($P < 0.01$),两组间比较无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠心脏组织 TGF- β_1 、Smad3、Smad7 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TGF- β_1	Smad3	Smad7
假手术组	7	1.16±0.26	1.37±0.96	1.06±0.13
模型组	6	5.48±0.53 ¹⁾	2.94±0.19 ¹⁾	0.53±0.08 ¹⁾
抗纤灵组	6	3.23±0.33 ³⁾	2.30±0.44 ³⁾	0.84±0.13 ²⁾
缬沙坦组	7	3.07±0.68 ³⁾	2.27±0.53 ³⁾	0.72±0.07 ²⁾

与假手术组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$

3 讨论

慢性肾衰竭病人心血管疾病的发生率是患肾脏疾病肾正常者的 5~10 倍,主要表现为心室肥大、心肌缺血、心力衰竭和心源性猝死。美国高血压联合报告中已明确将肾脏疾病列为心血管疾病的独立高危因素^[3]。慢性肾衰竭引起的心血管疾病与贫血、电解质紊乱、微炎症状态、氧化应激、局部肾素-血管紧张素激活、TGF- β_1 /Smad 通路等多种因素有关。西医的治疗主要为扩血管、对症处理、透析和移植等。

慢性肾衰竭在中医学上并无此病名,根据其主要表现可归属于“溺毒”“关格”“水肿”等范畴;而慢性肾衰竭引起的心脏病变又隶属于“心悸”“胸痹”等范畴。何立群教授认为本病的中医病机为肾气亏虚、瘀血阻络,瘀浊内停而循经上犯,心脉瘀阻致心失所养,日久发而为病。确立了活血化瘀、补肾泻浊的治疗方法,方选抗纤灵扶正泄浊,攻补兼施。抗纤灵方中丹参性微

寒,归心、肝经,补血活血;牛膝性平,归肝、肾经,补肾活血;桃仁性平,归心肝、大肠经,祛瘀活血;酒大黄性寒,归脾胃、大肠、心、肝经,清热泻浊活血,当归性温,归心、肝、脾经,补血活血。动物实验发现抗纤灵能抑制慢性肾衰竭大鼠肾组织 TGF- β_1 /Smad 通路的过度表达,抑制细胞外基质增生和积聚,促进细胞外基质的降解,具有改善肾纤维化和保护肾功能的作用^[4]。那么抗纤灵组方能否通过改善肾功能而减轻或预防肾功能不全引起的诸如心肌纤维化等心脏病变,有待更深入的研究。

作为国际公认的促纤维化生长因子 TGF- β_1 ,可促进心肌细胞和肾小球细胞外基质的合成与沉积,并通过 Smad 通路等加重心、肾纤维化的过程^[5]。Smad 家族被认为参与了多种原发性和继发性心脏疾病的生理病理过程,它是 TGF- β_1 信号传导通路里重要的效应因子,可被 TGF- β_1 通过细胞膜表面受体启动,然后将信号传导到细胞核内,能调节靶基因的转录从而诱导其下游因子的表达。研究表明作为 TGF- β_1 下游因子的 Smad3 被激活后能通过促进心肌纤维化引起心室重构^[6]。在心室长期处于压力超负荷的情况下,Smad3 作用增强,而 Smad7 作用减弱,这些都促进了 TGF- β_1 致心肌纤维化和心室重构的发展^[7]。Smad7 可抑制心肌成纤维细胞胶原蛋白的合成,作为抑制型 Smad,它与 TGF- β 受体复合物中的 TGF β RI 竞争性结合,阻断 Smad2、Smad3 的信号传导过程,抑制心室重构。除此之外,Smad7 还能与相对应的效应元件结合,通过分解 TGF- β_1 诱导的 Smad-DNA 复合物等方式起到抑制信号通路的作用^[8]。

本实验结果显示,模型组的小鼠心脏胶原面积较假手术组显著增大,提示心肌间质出现了明显的纤维化,由此可见,慢性肾衰竭引起心脏病变的造模是成功的。抗纤灵治疗后小鼠心脏胶原面积得到了明显改善,表明抗纤灵能改善心肌纤维化,从而影响慢性肾衰竭引起的心脏重构。缬沙坦是特异性 AT1 受体拮抗剂,能阻断血管紧张素 II 而具有抗细胞增殖和纤维化的效应。在抗心肌纤维化方面,抗纤灵组与缬沙坦组比较,两者无统计学意义,提示抗纤灵与缬沙坦疗效相当。治疗后抗纤灵组的 TGF- β_1 、Smad3 mRNA 较模型组下调,Smad7 mRNA 显著上调,与缬沙坦比较无统计学意义,表明该方能通过调节 TGF- β_1 /Smad 通路发挥抗心肌纤维化的效果。

综上所述,抗纤灵具有对抗慢性肾衰竭引起的心肌纤维化作用,其作用机制可能与下调 TGF- β_1 和 Smad3 mRNA 的表达、上调 Smad7 mRNA 的表达有关。

参考文献:

- [1] 胡峰,胡伟新,金洁.慢性肾功能衰竭患者合并心血管疾病发病机制的研究进展[J].医学研究生学报,2006,19(10):939-942.
- [2] 上海市肾脏病心血管并发症调查协作组.上海地区慢性肾功能衰竭患者心血管并发症的调查[J].中华肾脏病杂志,2001,17(2):91-94.
- [3] CHOBANIAN A V,BAKRIS G L,BLACK H R, *et al* .The seventh report of the joint national committee on prevention,detection,evaluation,and treatment of high blood pressure:the JNC 7 report[J].JAMA,2003,289(19):2560-2572.
- [4] 刘煜敏,张悦,何立群,等.抗纤灵方对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF- β_1 -Smad 通路的影响[J].中国病理生理杂志,2008,24(12):2423-2427.
- [5] GAULDIE J,BONNIAUD P,SIME P, *et al* .TGF- β ,Smad3 and the process of progressive fibrosis[J].Biochem Soc Trans,2007,35(4):661.
- [6] HUANG J,QIN G H,HU C X, *et al* .Effects of transforming growth factor- β 1 and signal protein Smad3 on rat cardiomyocyte hypertrophy[J].Chin Med J(Engl),2004,7(10):1471-1475.
- [7] BUJAK M,RATKAJ T,BAUSLONCAR M, *et al* . Microarray analysis of dupu- γ ren' Disease cell:the profibrogenic role of the TGF- β inducible P38 MAPK pathway[J].Cell Physiol Biochem,2012,30:927-942.
- [8] 任漪,路明,王静,等.卡维地洛对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构中 TGF- β /Smads 信号传导通路的作用[J].基础医学与临床,2013,33(11):1475-1479.

(收稿日期:2017-09-07)

(本文编辑 王雅洁)

天母降压片在小鼠模型中的镇痛、镇静作用研究

王 勇¹,赵婷婷²,代耀兰²,杨若聪³,李韶菁^{3,4}



摘要:目的 考察天母降压片的镇痛和镇静作用。方法 通过醋酸扭体实验、热板实验、热刺痛实验检测天母降压片的镇痛效果;通过悬尾实验观察天母降压片的镇静效果。结果 天母降压片在 1 次给药后可显著延长小鼠第 1 次舔足时间,降低舔足次数,增加甩尾反应潜伏期和痛阈值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);连续 3 d 给药后,可显著降低小鼠的扭体次数,显著延长不动时间,增加不动时间的延长时间($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 天母降压片具有一定的镇痛、镇静作用。

关键词:天母降压片;镇痛;镇静;小鼠;醋酸扭体实验;舔足时间

中图分类号:R544.1 R285.5 **文献标识码:**A **doi:**10.12102/j.issn.1672-1349.2019.03.011

高血压是一种病程长、病情复杂、伴随症状多的慢性疾病^[1-2]。不仅仅是高血压本身,高血压所伴随的并发症,在疾病过程中,亦给病人带来了不可忽视的负担^[3],伴疼痛^[4]、烦躁^[5]、焦虑^[6]等情绪,常常是高血压伴随的主要症状,而这些症状的改善,在现有的治疗中往往被忽略,但它都极大程度地影响着病人的生活质量。

根据中医治疗高血压的经验,高血压临床辨证最多的是阴虚阳亢型,常伴有身体多部位疼痛和精神焦虑的症状^[7-9]。天母降压片由天麻、珍珠母、钩藤、菊花、桑葚 5 味中药组成,其中君药天麻具有平肝潜阳、

息风止痉的功效^[10-11],临床上常用于肝阳上亢之头痛、眩晕等症,现代药理研究证实天麻能扩张血管,缓解神经肌肉的紧张;臣药珍珠母亦具有平肝潜阳之功,与天麻相配合,能增强降压功效,提高对高血压病相关症状的治疗效果^[12];方中钩藤、菊花等其他成分的有关临床和基础研究报道中亦发现有镇痛、镇静的作用^[13-14]。然而,关于天母降压片全方镇痛、镇静作用的有关研究报道较少。本研究拟通过醋酸扭体实验、热板法实验、热刺痛实验来评价天母降压片的镇痛作用;通过悬尾实验评价天母降压片的镇静作用。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 天母降压片粉末[华润三九(枣庄)药业有限公司,产品批号:201606];阿司匹林肠溶片(德国,拜耳医药保健有限公司,产品批号:BJ19030);地西洋片(山东信谊制药有限公司,产品批号:160601);醋酸(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器 智能热板仪:RB-200,成都泰盟软件有限公司;热刺痛仪:PL-200,成都泰盟软件有限公司;悬尾仪:TST-100,成都泰盟软件有限公司。

作者单位 1.华润三九医药股份有限公司(广东深圳 518110);2.西南交通大学生命科学与工程学院;3.北京中医药大学;4.中国中医科学院中药研究所

通讯作者 李韶菁,E-mail:shaolingli2004@126.com

引用信息 王勇,赵婷婷,代耀兰,等.天母降压片在小鼠模型中的镇痛、镇静作用研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(3):364-367.