

清肾颗粒对单侧输尿管梗阻致肾间质纤维化大鼠肾组织 Wnt/ β -catenin 信号通路的干预作用

任克军^{1,2}, 王东², 王亿平², 胡顺金², 张磊², 金华², 王小琴³

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065; 2. 安徽中医药大学第一附属医院肾病科, 安徽 合肥 230031; 3. 湖北中医药大学附属医院肾病科, 湖北 武汉 430061)

[摘要]目的 基于 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号转导通路探讨清肾颗粒抗肾间质纤维化的作用机制。

方法 将 38 只 SD 大鼠随机分为清肾颗粒组、贝那普利组、模型组和假手术组。采用单侧输尿管梗阻法复制肾间质纤维化模型。模型复制成功后,清肾颗粒组和贝那普利组大鼠分别给予清肾颗粒、贝那普利灌胃,假手术组和模型组给予等容积温水灌胃,疗程均为 4 周。检测 24 h 尿蛋白定量、血清肌酐、尿素氮水平以及肾脏组织中 Wnt1、 β -catenin 和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)含量。**结果** 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血尿素氮、血清肌酐、Wnt1、 β -catenin 水平均高于假手术组($P < 0.05$),E-cadherin 水平低于假手术组($P < 0.05$);与模型组比较,清肾颗粒组和贝那普利组 24 h 尿蛋白定量、血尿素氮、血清肌酐、Wnt1、 β -catenin 水平明显降低($P < 0.05$),E-cadherin 水平明显升高($P < 0.05$),清肾颗粒组上述指标的改善显著优于贝那普利组($P < 0.05$)。**结论** 清肾颗粒改善肾间质纤维化的机制与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

[关键词] 肾间质纤维化;清肾颗粒;Wnt1; β -连环蛋白;E-钙黏蛋白

[中图分类号] R285.5;R692.2 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.02.017

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发展至终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)的共同病理基础^[1-2]。研究^[3]证实,Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路的激活在 RIF 过程中具有重要作用。清肾颗粒是临床经验方,前期研究^[4-9]已显示其具有良好疗效。本研究采用单侧输

尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)复制 RIF 大鼠模型,观察大鼠肾组织中 Wnt/ β -catenin 信号转导通路中 Wnt1、 β -catenin 和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达及清肾颗粒的干预作用,现将结果报道如下。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 雄性大鼠 43 只,体质量(220±20)g,购自安徽医科大学实验动物中心,生产许可证号为 SCXK(皖)2011-002。动物房温度在 22℃左右,湿度在 50%左右。

1.2 试药 清肾颗粒:由生大黄、丹参、黄连等药物组成,安徽中医药大学第一附属医院制剂中心加工

基金项目:国家自然科学基金项目(81473673,81673931,81403372);安徽省自然科学基金项目(1508085MH198);安徽省教育厅基金重点项目(KJ2016A402)

作者简介:任克军(1979-),男,博士研究生

通信作者:王小琴, wangxiao773@hotmail.com

RT-qPCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and p27 in the renal cortex in rats. **Results** The spontaneously hypertensive rats had significantly higher levels of SCr and BUN than the normal rats before and after treatment ($P < 0.05$). After treatment, the high- and low-dose Yanggan Yishui Granule groups and the benazepril group had significant reductions in the levels of SCr and BUN ($P < 0.05$), but there were no significant differences between the three groups ($P > 0.05$). The model group had significantly higher mRNA and protein expression of p27 and TGF- β_1 in the renal cortex than the normal group ($P < 0.05$). After treatment, compared with the low-dose Yanggan Yishui Granule group, the high-dose Yanggan Yishui Granule group had significant reductions in the mRNA and protein expression of p27 and TGF- β_1 ($P < 0.05$). **Conclusion** Yanggan Yishui Granule can protect the kidney through down-regulating the expression of p27 and TGF- β_1 , regulating the proliferation and apoptosis of podocytes, and maintaining the normal morphology and structure of podocytes.

[Key words] Yanggan Yishui Granule; Hypertensive kidney injury; Transforming growth factor- β_1 ; p27

成颗粒剂,每袋 10 g,院内制剂生产批号为 BZ20150721,配制成 0.4 g/mL 水溶液。贝那普利(洛汀新):每片 10 mg,北京诺华制药公司生产,配制成 0.016 g/mL 的混悬液。Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 试剂盒(Western blot 法):均购自武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 PB0484、BM1575 和 BA0475。

2 方法

2.1 模型复制及动物分组 将 43 只 SD 大鼠喂养 1 周后,采用 UUO 方法^[10]复制 RIF 大鼠模型。操作步骤:SD 大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,选择左侧肋腰点为切口,局部剃毛,无菌操作,铺巾,依次切开皮肤、肌层至腹腔,游离左侧肾脏、输尿管,除假手术组 10 只逐层缝合皮肤外,其余 33 只大鼠均用丝线在输尿管两端结扎,结扎后剪断输尿管,逐层缝合皮肤。将 43 只大鼠随机分为清肾颗粒组 11 只、贝那普利组 11 只、模型组 11 只、假手术组 10 只。

2.2 给药方法 各组大鼠均在模型复制后次日开始灌胃,每日 1 次。清肾颗粒组每日给予清肾颗粒水溶液 4 g/kg(相当于成人临床用量 6 倍)灌胃;贝那普利组每日给予贝那普利水溶液 0.16 g/kg(相当于成人临床用量 6 倍)灌胃;模型组和假手术组每日给予等量蒸馏水灌胃。疗程均为 4 周。

2.3 观察指标 各组大鼠于给药后 4 周处死,处死前 1 d 用代谢笼收集 24 h 尿液,检测 24 h 尿蛋白定量(24-hour urinary protein, 24hUP)。腹主动脉取血,采用生化法检测血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)。留取术侧肾脏,置于冻存管于 -70 °C 冰箱中保存,Western

blot 法检测 Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 的含量。主要步骤:用总蛋白裂解液提取肾脏总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度;每泳道上样 30 μ g 蛋白,电泳、转膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,轻洗,一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后再以 HRP 标记的二抗孵育;洗膜、加 ECL 液,Fujifilm 化学发光成像系统拍照。采用 Image Pro Plus 6.0 分析各条带的累计光密度值,将各目的条带与同一泳道内参照 β -actin 的累计光密度值的比值作为该泳道中目的蛋白的相对表达水平。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计分析进行统计学分析。连续型变量采用“均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。采用单因素方差分析,均数的多重比较采用 LSD 检验;若数据不符合正态分布,则采用非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况比较 因麻醉药过量、感染等原因,导致大鼠死亡 5 只。实验过程中,模型组大鼠活动量、摄食量减少,精神差,体质量增长缓慢,体毛粗糙无光泽。清肾颗粒组大鼠活动量、摄食量增加,精神逐渐好转,体质量增长快,体毛稍光泽。贝那普利组大鼠介于清肾颗粒组和模型组之间。假手术组大鼠术后第 1 天活动量、摄食量减少,第 2 天恢复正常。

3.2 各组大鼠 BUN、SCr 和 24hUP 水平比较 清肾颗粒组、贝那普利组、模型组大鼠 BUN、SCr、24hUP 水平均高于假手术组($P<0.05$);与模型组比较,清肾颗粒组和贝那普利组 BUN、SCr、24hUP 水平显著降低($P<0.05$),且清肾颗粒组优于贝那普利组($P<0.05$)。见表 1。

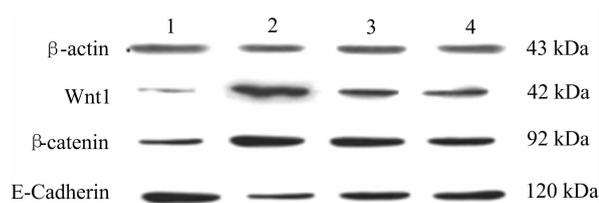
表 1 各组大鼠 BUN、SCr 和 24hUP 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BUN/(mmol/L)	SCr/(μ mol/L)	24hUP/mg
假手术	10	5.12 \pm 0.61	54.41 \pm 3.76	2.73 \pm 0.52
模型	9	15.06 \pm 1.62*	112.65 \pm 8.43*	10.16 \pm 1.13*
贝那普利	9	10.12 \pm 0.92 [#]	93.05 \pm 7.64 [#]	6.74 \pm 0.54 [#]
清肾颗粒	10	8.79 \pm 0.87 ^{#Δ}	82.16 \pm 5.74 ^{#Δ}	4.63 \pm 0.52 ^{#Δ}

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与贝那普利组比较, Δ $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠肾组织中 Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 表达水平比较 模型组大鼠肾组织中 Wnt1、 β -catenin 水平显著高于假手术组($P<0.05$),E-cadherin 水平显著低于假手术组($P<0.05$);与模型组比较,清肾颗粒组和贝那普利组大鼠肾组织中 Wnt1、 β -catenin 表达水平明显降低($P<0.05$),E-cadherin 表达水平明显升高($P<0.05$);清肾颗粒组 Wnt1、 β -catenin 水平低于贝那普利组($P<0.05$),E-cadherin 表达水平高于贝那普利组($P<$

0.05)。见表 2 和图 1。



注:1.假手术组;2.模型组;3.贝那普利组;4.清肾颗粒组。

图 1 Western blot 检测各组大鼠肾组织中 Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 表达水平

表2 各组大鼠肾组织中 Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Wnt1	β -catenin	E-cadherin
假手术	10	0.23±0.02	0.42±0.04	3.09±0.16
模型	9	5.47±0.26*	5.18±0.23*	0.37±0.04*
贝那普利	11	3.39±0.15*#	2.97±0.15*#	1.48±0.12*#
清肾颗粒	10	2.51±0.13 Δ #	2.16±0.12 Δ #	2.03±0.14 Δ #

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与贝那普利组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

4 讨论

Wnt/ β -catenin 信号途径与肾纤维化的形成息息相关,在 RIF 的发生发展中发挥重要作用^[11]。抗肾纤维化的治疗一直是延缓慢性肾脏病进展的主要干预靶点,对于 Wnt/ β -catenin 信号转导通路在 RIF 发生发展中的作用机制的深入研究,可为抗肾纤维化的治疗提供新的突破口和干预靶点。Wnt 信号通路主要的生理功能是按程序规律地激活和静止,它分泌的糖脂蛋白,是生物正常组织分化的诱导信号,参与胚胎进化以及组织发育过程中的细胞增殖、极化和凋亡^[12-14]。作为一种细胞骨架蛋白, β -catenin 在细胞中发挥双重作用,在细胞膜上与 E-cadherin 形成细胞黏附连接复合体(E-cadherin/ β -catenin 复合体),介导同型细胞间的黏附,维持正常上皮的极性和完整性。 β -catenin 又是 Wnt/ β -catenin 信号途径下游的关键效应因子,Wnt 信号途径能引起胞内 β -catenin 积累。

研究表明,正常机体肾脏中 Wnt/ β -catenin 信号是“静止”的,胞质中仅有少量游离态的 β -catenin,体内绝大多数 β -catenin 在胞膜处与 E-cadherin 形成复合体,对维持同型细胞的黏附、防止细胞的迁移发挥作用^[15]。Surendran 等^[16]利用 UO 方法复制大鼠 RIF 模型,发现 Wnt4 在集合管中有表达且伴随集合管周围纤维化的形成,间质成纤维细胞 Wnt4 高水平表达与 I 型胶原 mRNA 及 α -平滑肌肌动蛋白的高表达成正相关;体外实验也表明,Wnt4 可以诱导培养的成纤维细胞 β -catenin 进入细胞核内。Wnt/ β -catenin 途径还可通过调节基质蛋白酶-7 的表达而破坏肾小管上皮细胞基底膜,推进细胞迁移,促使 RIF 进展^[17]。另有研究发现,在 UO 大鼠肾脏纤维化过程中,Wnt 蛋白家族中除了 Wnt5b、Wnt8b 和 Wnt9b 外,其他 Wnt 蛋白均表达上调, β -catenin 在肾小管上皮细胞胞质及胞核聚集,Wnt/ β -catenin 途径拮抗剂 Dickkopf-1(DKK-1)能够抑制肌成纤维细胞的活化及成纤维细胞特异蛋白、I 型胶原、纤维连接蛋白的表达,提示肾脏纤维化中经典 Wnt/ β -catenin 信号途径被激活,推动肾

小管间质纤维化进程,下调该途径活性在一定程度上能够减轻肾脏纤维化程度^[11]。

清肾颗粒主要由生大黄、丹参、黄连、白术等药物组成,具有清热化湿祛瘀之功效。本研究结果显示,模型组大鼠 Wnt1、 β -catenin 水平高于假手术组($P < 0.05$),E-cadherin 水平低于假手术组($P < 0.05$),说明 Wnt/ β -catenin 信号通路参与了 UO 模型 RIF 的形成。与模型组比较,清肾颗粒组和贝那普利组 Wnt1、 β -catenin 水平明显降低($P < 0.05$),E-cadherin 水平明显升高($P < 0.05$);亦可降低 BUN、SCr、24hUP 水平,清肾颗粒组优于贝那普利组($P < 0.05$)。表明清肾颗粒可以改善 UO 模型大鼠肾功能,减少 24hUP,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化,从而延缓 UO 模型大鼠 RIF。

参考文献:

- [1] PONNUSAMY M, ZHOU X, YAN Y, et al. Blocking sirtuin 1 and 2 inhibits renal interstitial fibroblast activation and attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 350(2): 243-256.
- [2] ELISABETH S, VERONIKA W, JENS S. Cyclic nucleotide signalling in kidney fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2): 2320-2351.
- [3] 付旭,李均,阳小敏,等. 黄芪丹参颗粒药对干预肾纤维化 Wnt/ β -catenin 信号通路的实验研究 [J]. 世界科学技术:中医药现代化,2014,16(1):103-108.
- [4] 王亿平,王东,程皖,等. 清肾颗粒对湿热型慢性肾衰竭急剧加重患者血浆 P-选择素及细胞间黏附分子-1 的干预作用 [J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(11): 982-985.
- [5] 王亿平,戴昭秋,王东,等. 清肾颗粒对慢性肾衰竭湿热证患者血清纤维连接蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的影响 [J]. 中华中医药杂志,2015,30(3): 872-875.
- [6] 王亿平,章雪莲,王东,等. 清肾颗粒对慢性肾衰竭湿热证患者肾纤维化的治疗作用及其机制 [J]. 中国中西医结合急救杂志,2015,22(6): 561-564.
- [7] 王亿平,戴昭秋,王东,等. 中药清肾颗粒对肾纤维化大鼠黏着斑激酶-Ras-丝裂素活化蛋白激酶信号转导通路的干预作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志,2015,22(1): 28-32.
- [8] 王亿平,王东,李传平,等. 清热化湿祛瘀法对慢性肾衰竭湿热证患者多中心随机对照的临床研究 [J]. 北京中医药大学学报,2016,39(9): 774-778.
- [9] 王亿平,王东,金华,等. 清肾颗粒对慢性肾衰竭湿热证患者免疫炎症的干预作用 [J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(12): 1425-1429.
- [10] 董飞侠,何立群,黄迪,等. 单侧输尿管结扎再通大鼠模型的建立方法及其评价 [J]. 中国比较医学杂志,

- 2010(3):30-34,85.
- [11] HE W, DAI C, LI Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*,2009,20(4):765-776.
- [12] MAIESE K, LI F, CHONG Z Z. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist[J]. *Pharmacol Ther*,2008,118(1):58-81.
- [13] LI F, CHONG Z Z, MAIESE K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise [J]. *Histol Histopathol*,2006,21(1):103-124.
- [14] MAC DONALD B T, TAMAI K, HE X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*,2009,17(1):9-26.
- [15] HE X. Cilia put a brake on wnt signaling[J]. *Nat Cell Biol*,2008,10(1):11-13.
- [16] SURENDRAN K, SCHIAVI, HRUSKA K A. Wnt-dependent beta catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16 (8):2373-2384.
- [17] SURENDRAN K, SIMON T C, LIAPIS H, et al. Matrilysin (MMP-7) expression in renal tubular damage: association with Wnt4[J]. *Kidney Int*,2004,65 (6):2212-2222.

(收稿日期:2017-01-01;编辑:姚实林)

Interventional Effect of Qingshen Granule on the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Renal Tissue in Rats with Renal Interstitial Fibrosis Caused by Unilateral Ureteral Obstruction

REN Ke-jun^{1,2}, WANG Dong², WANG Yi-ping², HU Shun-jin², ZHANG Lei², JIN Hua², WANG Xiao-qin³

(1. *Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430065, China*; 2. *Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China*; 3. *Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061, China*)

[Abstract]Objective To investigate the mechanism of action of Qingshen Granule in the treatment of renal interstitial fibrosis based on the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** A total of 38 Sprague-Dawley rats were randomly divided into Qingshen Granule group, benazepril group, model group, and sham-operation group. Unilateral ureteral obstruction was performed to establish a rat model of renal interstitial fibrosis. Then the rats in the Qingshen Granule group and the benazepril group were given Qingshen Granule or benazepril by gavage, and those in the sham-operation group and the model group were given warm water of the same volume by gavage. The course of treatment was 4 weeks. The 24-hour urine protein quantitation, serum creatinine, and urea nitrogen were measured, as well as the levels of Wnt1, β -catenin, and E-cadherin in renal tissue. **Results** Compared with the sham-operation group, the model group had significantly higher levels of 24-hour urine protein quantitation, blood urea nitrogen, serum creatinine, Wnt1, and β -catenin ($P < 0.05$) and a significantly lower level of E-cadherin ($P < 0.05$). Compared with the model group, the Qingshen Granule group and the benazepril group had significant reductions in the levels of 24-hour urine protein quantitation, blood urea nitrogen, serum creatinine, Wnt1, and β -catenin ($P < 0.05$) and a significant increase in the level of E-cadherin ($P < 0.05$); the Qingshen Granule group had significantly better improvements than the benazepril group ($P < 0.05$). **Conclusion** Qingshen Granule can improve renal interstitial fibrosis possibly by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words]Renal interstitial fibrosis; Qingshen Granule; Wnt1; β -Catenin; E-cadherin