

# 清肾颗粒对肾纤维化大鼠 P-selectin/PSGL-1 的干预作用

陈友雪<sup>1</sup>, 王亿平<sup>2</sup>, 金 华<sup>2</sup>, 王 东<sup>2</sup>, 张 磊<sup>2</sup>

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学第一附属医院肾病科, 安徽 合肥 230031)

**[摘要]**目的 观察清肾颗粒对5/6肾切除肾纤维化模型大鼠肾组织P-选择素(P-selectin)/P-选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)表达的影响及其抗肾纤维化的作用机制。方法 将72只雄性SD大鼠随机分为正常组, 模型组, 清肾颗粒高、中、低剂量组, 氯沙坦组, 每组12只; 除正常组外, 剩余60只大鼠均按手术方法制备5/6肾切除肾纤维化模型, 各组动物均从模型复制1周后开始灌胃给药, 清肾颗粒各剂量组和氯沙坦组分别予以一定比例的清肾颗粒和氯沙坦水溶液灌胃, 模型组和正常组均以等比例温水灌服。12周后处死大鼠, 取残余肾组织用于检测P-selectin/PSGL-1蛋白及其mRNA的表达水平。结果 与正常组比较, 模型组P-selectin、PSGL-1蛋白及其mRNA相对表达水平明显升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 清肾颗粒各剂量组和氯沙坦组P-selectin、PSGL-1蛋白及其mRNA表达水平降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与氯沙坦组比较, 清肾颗粒高剂量组P-selectin、PSGL-1蛋白及其mRNA表达水平降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 清肾颗粒各组之间比较, 清肾颗粒高剂量组P-selectin、PSGL-1蛋白及其mRNA表达水平最低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 清肾颗粒能够降低5/6肾切除大鼠肾组织P-selectin及PSGL-1的表达, 这可能是其抗肾纤维化的机制之一。

**[关键词]**清肾颗粒; P-选择素; P-选择素糖蛋白配体-1; 肾纤维化

**[中图分类号]**R285.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.01.017

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是一个重要的世界性健康问题, 其病理基础是肾纤维化。前期研究表明, CKD患者P-选择素(P-selectin)水平表达异常, 提示P-selectin与肾脏纤维化过程密切相关<sup>[1]</sup>。P-selectin的表达可能成为肾脏病变的标志, 其与P-选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)的结合是启动炎症反应和维持炎症状态的一个关键因素<sup>[2-3]</sup>。本实验拟观察清肾颗粒是否能够通过抑制P-selectin和PSGL-1的表达, 从而达到抗5/6肾切除大鼠肾纤维化的作用。

## 1 材料

1.1 动物 选取72只雄性SD大鼠, 体质量(200±20)g, 全部购自上海杰思捷实验动物有限公司[生产许可证号: SCXK(沪)2013-0006]。

1.2 药物与试剂 清肾颗粒由生大黄、白花蛇舌草、丹参、泽泻等药物组成。药材由安徽中医药大学第一附属医院药房统一进货, 每袋颗粒剂10g, 皖药制字BZ20080011。氯沙坦钾由默沙东公司生产, 每粒50mg, 国药准字H20130409。CD62P/P-Selectin

抗体、CD162/PSGL-1抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为AG09117573、AD110342。

## 2 方法

2.1 模型复制与分组 除正常组12只之外, 其余60只大鼠均按文献[4]方法复制5/6肾切除肾纤维化模型。将大鼠禁食12h, 麻醉, 俯卧位固定于手术台上, 从距左脊肋骨1.5cm处斜向外方切口, 暴露左肾, 分离肾周围脂肪囊后, 弧形切除肾上、下极各1/3, 用明胶海绵压迫止血1min, 复位肾脏, 缝合。1周后切除整个右肾, 2次共切除5/6肾脏。采用SPSS 17.0产生的随机号随机分为模型组, 清肾颗粒高、中、低剂量组, 氯沙坦组, 每组12只。

2.2 给药方法 各组动物均在模型复制后第1天开始灌胃, 每日1次, 每次2mL。正常组、模型组分别采用等容量温水灌胃; 清肾颗粒低、中、高剂量组分别按每日4.0、8.0、16.0g/kg(4.0g/kg为成人临床等效剂量)给予清肾颗粒水溶液灌胃; 氯沙坦组给予氯沙坦钾混悬液(每日13mg/kg, 近似临床等效药量)灌胃。连续给药12周。

2.3 标本留取 将大鼠麻醉后仰卧位固定于手术台上, 取出左肾, 并将取出的肾组织修剪掉纤维结缔组织, 用生理盐水冲洗后, 将肾组织迅速放入液氮, 并置于-70℃冰箱中保存, 用于提取P-selectin、PSGL-1蛋白及其RNA。

**基金项目:**国家自然科学基金项目(81473673, 81673931)

**作者简介:**陈友雪(1993-), 女, 硕士研究生

**通信作者:**王亿平(1963-), 男, 硕士, 主任医师, 教授, [wypwyp54@aliyun.com](mailto:wypwyp54@aliyun.com)

2.4 观察指标 Western blot 法检测肾脏组织中 P-selectin 及 PSGL-1 的蛋白表达水平; RT-PCR 法检测肾脏组织中 P-selectin、PSGL-1 mRNA 表达水平。引物序列如下:

P-selectin: 5'-CTGAGAACTGGGCAGAC-3', 5'-GGTAGCAGGAGCAGGTGTA-3', 220 bp。

PSGL-1: 5'-CTACCAAAGAGGTCTGTTTCAT-3', 5'-TGTGCAGGGTGAGGTCATC-3', 395 bp。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。连续型变量采用“均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )”进行统计学描述。多组间数据比较采用单因素方差分析(数据全呈正态分布)或非参数检验(数据不全呈非

正态分布)。P<0.05 表示差异有统计学意义。

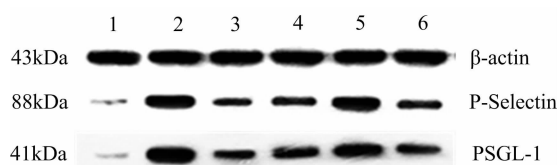
### 3 结果

与正常组比较,模型组 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 相对表达水平明显升高,差异均有统计学意义(P<0.05);与模型组比较,清肾颗粒各剂量组和氯沙坦组 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达水平降低,差异均有统计学意义(P<0.05);与氯沙坦组比较,清肾颗粒高剂量组 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达水平降低,差异均有统计学意义(P<0.05);清肾颗粒各组之间比较,清肾颗粒高剂量组 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达水平最低,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠肾脏组织中 P-selectin 和 PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	P-selectin	PSGL-1	P-selectin mRNA	PSGL-1 mRNA
正常	12	0.129±0.022	0.129±0.022	0.970±0.070	1.004±0.098
模型	12	1.307±0.099*	1.431±0.157*	3.420±0.240*	3.929±0.427*
氯沙坦	11	0.650±0.081#	0.745±0.112#	2.881±0.838#	2.234±0.130#
清肾颗粒高剂量	12	0.516±0.060#△	0.509±0.016#△	1.432±0.288#△	1.324±0.143#△
清肾颗粒中剂量	11	0.689±0.054#◇	0.745±0.026#◇	1.967±0.367#◇	2.081±0.224#◇
清肾颗粒低剂量	12	0.911±0.040#△◇	0.823±0.037#△◇	2.362±0.317#◇	2.524±0.204#◇

注:与正常组比较,\*P<0.05;与模型组比较,#P<0.05;与氯沙坦组比较,△P<0.05;与清肾颗粒高剂量组比较,◇P<0.05



注:1. 正常组;2. 模型组;3. 清肾颗粒高剂量组;4. 清肾颗粒中剂量组;5. 清肾颗粒低剂量组;6. 氯沙坦组

图 1 Western blot 法检测各组大鼠 P-selectin、PSGL-1 表达水平

### 4 讨论

肾纤维化是 CKD 的病理基础,其过程是不可逆的,而最终发展结局是终末期肾脏病,因此如何延缓这一过程是亟待解决的关键问题。相关文献表明,肾脏组织炎症病变在肾纤维化发生及进展中起到至关重要的作用<sup>[5]</sup>。肾单位毛细血管参与血浆滤过和再吸收、组织供氧和营养等重要环节,内皮细胞损伤推动慢性肾脏病发展的进程<sup>[6]</sup>。而 P-selectin 是炎症、组织损伤时重要的黏附分子,可通过介导内皮细胞黏附、血小板与白细胞相互作用,参与炎症反应<sup>[7]</sup>。PSGL-1 作为一种重要的炎症分子,主要表达于各种白细胞,是目前被发现的 P-selectin 中最主要的糖蛋白配体。PSGL-1 的作用不但可以促进白细胞的黏附,而且还在激活白细胞的过程中作为信号分子传递信号<sup>[8]</sup>。内皮细胞上的 P-selectin 与白细胞上 PSGL-1 结合,可驱动白细胞在炎症部位血管内皮表面滚动减缓,并通过反复黏附过程,促使白细胞迁移进入炎

症局部,参与肾脏纤维化过程的一系列炎症反应,而针对 P-selectin 及配体的抗黏附干预,可有效抑制纤维化形成及白细胞的炎症浸润。

清肾颗粒为清热化湿、祛瘀泄浊的中药复方,其用于慢性肾衰竭湿热证患者,疗效显著。前期实验研究<sup>[9-12]</sup>表明,湿热证是慢性肾衰竭患者的主要中医证候,慢性肾衰竭湿热证与肾脏炎症状态及高表达的炎症因子密切相关;具有清热化湿祛瘀功效的中药复方清肾颗粒能够显著降低慢性肾衰竭患者血浆 P-selectin 水平,发挥其保护肾功能、抗肾脏纤维化的作用。

本次研究结果表明,5/6 肾切除大鼠肾组织中 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达水平明显高于正常组(P<0.05),经药物干预后,各治疗组大鼠 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达均显著下降(P<0.05),其中清肾颗粒高剂量组较氯沙坦组显著降低(P<0.05),清肾颗粒 3 个剂量组中,高剂量组 P-selectin、PSGL-1 蛋白及其 mRNA 表达水平最低(P<0.05);结果提示清肾颗粒能够降低 P-selectin 及其配体的蛋白和基因表达,其作用优于氯沙坦,且呈量效关系。清肾颗粒通过从基因转录和蛋白翻译两个方面下调肾组织 P-selectin 和 PSGL-1 的表达,从而发挥抗肾脏纤维化作用。

#### 参考文献:

[1] 宋宣,梁俊,尹小鹏. P-选择素检测在慢性肾脏病中的价值研究[J]. 武警后勤学院学报(医学版),2014,23(6):

- 507-509.
- [2] ZACHEM C R, ALPERS C E, WAY W, et al. A role for P-selectin in neutrophil and platelet infiltration in immune complex glomerulonephritis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8(12):1838-1844.
- [3] MCEVER R P, CUMMINGS R D. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(3):485-491.
- [4] XIN L, YAN Z, XIANG Z Z, et al. Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in inducing apoptosis and renal fibrosis in 5/6-nephrectomized rats[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6):3575-3582.
- [5] 陈凤, 戴恩来. 中西医对肾纤维化发病机制的研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(6):1243-1246.
- [6] OZKOK A, YILDIZ A. Endothelial progenitor cells and kidney diseases[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43(3):701-718.
- [7] 赵亚鹏, 金佩佩, 周同, 等. P-选择素及其细胞黏附与血栓形成[J]. *细胞生物学杂志*, 2007(1):22-26.
- [8] WANG H B, WANG J T, GENG J G, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(8):882-892.
- [9] 王飞, 王亿平, 王东, 等. 清肾颗粒对慢性肾功能衰竭急剧加重湿热证患者血清白细胞介素-8 和白介素-18 的干预作用[J]. *中医药临床杂志*, 2011, 23(7):608-610.
- [10] 王亿平, 王东, 程皖, 等. 清肾颗粒对湿热型慢性肾衰急剧加重患者血浆 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.
- [11] 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.
- [12] 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  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3):872-875.

(收稿日期:2018-08-19;编辑:曹健)

## Effect of Qingshen Granule on P-selectin and P-selectin Glycoprotein Ligand 1 in Rats with Renal Fibrosis

CHEN You-xue<sup>1</sup>, WANG Yi-ping<sup>2</sup>, JIN Hua<sup>2</sup>, WANG Dong<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Qingshen Granule on the expression of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) in renal tissue in 5/6 nephrectomized rats with renal fibrosis and its anti-renal fibrosis effect. **Methods** A total of 72 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, high-, middle-, and low-dose Qingshen Granule groups, and losartan group, with 12 rats in each group. All rats except those in the normal group were given surgical treatment to establish a 5/6 nephrectomized rat model of renal fibrosis, and the drugs were given by gavage since one week after modeling. The rats in the high-, middle-, and low-dose Qingshen Granule groups and the losartan group were given Qingshen Granule at a certain concentration or losartan (dissolved in water) by gavage, and those in the model group and the normal group were given an equal volume of warm water by gavage. The rats were sacrificed after 12 weeks and renal tissue was collected to measure the protein and mRNA expression of P-selectin and PSGL-1. **Results** Compared with the normal group, the model group had significant increases in the protein and mRNA expression of P-selectin and PSGL-1 ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the high-, middle-, and low-dose Qingshen Granule groups and the losartan group had significant reductions in the protein and mRNA expression of P-selectin and PSGL-1 ( $P < 0.05$ ). Compared with the Losartan group, the high-dose Qingshen Granule group had significant reductions in the protein and mRNA expression of P-selectin and PSGL-1 ( $P < 0.05$ ). Among the three Qingshen Granule groups, the high-dose Qingshen Granule group had the lowest protein and mRNA expression of P-selectin and PSGL-1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Qingshen Granule can reduce the expression of P-selectin and PSGL-1 in renal tissue in 5/6 nephrectomized rats, which might be one of its anti-renal fibrosis mechanisms.

**[Key words]** Qingshen Granule; P-selectin; P-selectin glycoprotein ligand 1; Renal fibrosis