

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.001
文章编号: 1005-8982(2017)27-0001-06

基础研究·论著

五味子乙素抗肾纤维化作用及机制研究*

郑海洲, 张杰, 肖程程, 秦聪, 徐涛
(武汉大学人民医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430060)

摘要:目的 探讨五味子乙素对肾纤维化的改善作用及其机制。**方法** 以分别不同剂量的五味子乙素给缺血再灌注(I/R)模型小鼠灌胃。通过 Masson 染色对各组小鼠肾纤维化进行评价,免疫组织化学染色检测各组小鼠肾组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原蛋白(Collagen I)的表达;Western blot 法检测各组小鼠肾组织 α -SMA、Collagen I、上皮性钙粘蛋白(E-cadherin)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)和 p-Smad3 的表达水平。**结果** Masson 染色结果显示,五味子乙素治疗组较 I/R 组小鼠肾间质纤维化及小管萎缩减轻;免疫组织化学染色结果显示,治疗组较 I/R 组 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达减少;Western blot 检测结果显示,治疗组较 I/R 组 E-cadherin 表达增高, α -SMA、Collagen I、TGF- β_1 和 p-Smad3 表达均下降,且呈现出剂量效应。**结论** 五味子乙素具有抗肾纤维化的作用,其机制可能与抑制 TGF- β /Smad 信号通路有关,提示五味子乙素有望成为抗肾纤维化的临床治疗药物。

关键词: 肾纤维化;五味子乙素;缺血再灌注;治疗

中图分类号: R692

文献标识码: A

Protective effect of Schisandrin B on renal fibrosis and underlying mechanism*

Hai-zhou Zheng, Jie Zhang, Cheng-cheng Xiao, Cong Qin, Tao Xu
(Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To investigate the protective of Schisandrin (Sch B) on renal fibrosis and underlying mechanism. **Methods** Mice were subjected to ischemia-reperfusion (I/R) injury in presence or absence of Sch B. Masson staining was performed for morphological grading of renal fibrosis. α -SMA and Collagen I expression in kidney tissue were determined by Immunohistochemistry. The expression levels of α -SMA, collagen I, E-cadherin, transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and p-Smad3 were measured by Western blot. **Results** Renal fibrosis and tubular atrophy were significantly alleviated by Sch B treatment when compared with I/R group. Immunohistochemistry staining showed that α -SMA and Collagen I in the I/R group increased significantly, which was attenuated by Sch B. Western blot suggested that, in the Sch B group, the expression of E-cadherin was increased while α -SMA, Collagen I, TGF- β_1 and p-Smad3 decreased dramatically in a dose dependent manner in comparison with those in the I/R group. **Conclusions** Data confirms that SchB can ameliorate renal fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling pathway, which could be a potential therapeutic intervention for renal fibrosis.

Keywords: renal fibrosis; Schisandrin B; ischemia reperfusion

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease,CKD)全球患病率为 8%~16%,已成为全球性公共卫生问

题^①。研究表明,超过 60%的急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)患者会逐渐发展为 CKD,CKD 患者

收稿日期:2017-06-01

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81470923)

[通信作者] 张杰,E-mail:zhangjiewhu666@163.com

更易发生 AKI, AKI 也会加速 CKD 进程^[2-3]。肾间质纤维化是各种 CKD 发展为终末期肾衰竭的共同途径^[4]。因此,治疗肾间质纤维化是预防与治疗慢性肾脏疾病的关键。

肾小管上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肾间质纤维化发生、发展的重要机制,EMT 是指肾小管上皮细胞的表型发生改变,丧失上皮细胞表型,获得间质细胞特征^[5]。大量研究表明,转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)是最主要的促纤维化因子,五味子乙素能通过抑制 TGF- β_1 信号通路发挥抗血管纤维化作用^[6],五味子乙素还可减轻四氯化碳引起的肝细胞损伤,对缺血再灌注引起的心肌细胞损伤也有一定的保护作用^[7]。五味子乙素对肾纤维化是否具有保护作用,目前尚无文献报道。本实验通过小鼠体内研究,探索五味子乙素对肾脏纤维化的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与动物

20 只健康雄性 C57BL/6 小鼠(购自武汉大学医学院动物实验中心,动物号:S0271605051A),体重 20~25 g。五味子乙素(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度 >98%),兔抗小鼠 GAPDH、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)、上皮性钙粘蛋白(E-cadherin)、I 型胶原蛋白(collagen I)、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1)和 p-Smad3 抗体(购自美国 Abcam 公司),Masson 染色试剂盒、DAB 试剂盒、橄榄油、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、Marker 和 BCA 蛋白定量试剂盒(购自湖北省武汉谷歌公司),微量移液器(购自德国 Eppendorf 公司),离心机(购自德国 Thermo 公司),超级纯水仪(购于美国 Millipore 公司),显微镜(购自日本 Olympus 公司),Odyssey 双色红外荧光成像系统(购自美国 LI-COR 公司)。

1.2 分组及复制 I/R 模型

20 只小鼠随机分成 4 组:①假手术组(Sham);②肾缺血再灌注模型组(I/R);③低剂量治疗组(五味子乙素 10 mg/kg 灌胃);④高剂量治疗组(五味子乙素 20 mg/kg 灌胃);每组 5 只。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉,常规消毒,于左侧肋缘下切开约 1~1.5 cm,暴露左肾后仔细剔除肾蒂周围脂肪组织以暴露血管,用微血管钳夹闭血管 25 min,以

相同操作夹闭右侧血管 25 min(右侧切口比左侧低约 0.5 cm),血管夹闭 1~2 min 后可观察到肾外观逐渐由红色变为深紫色。切口逐层缝合,75%酒精消毒后将小鼠置于恒温孵化器中。Sham 组仅剥离脂肪组织,不夹闭血管。治疗组手术当天即开始给予药物灌胃,持续 15 d;Sham 组及 I/R 组给予等量的橄榄油(10 ml/kg)灌胃 15 d。

1.3 取材

在 I/R 模型小鼠术后 10 周,戊巴比妥钠腹腔麻醉后取小鼠左肾,颈椎脱臼处死小鼠。部分肾组织加 4%的多聚甲醛固定以作病理分析,另一部分置于 -80℃冰箱冷冻保存备用。

1.4 观察各组肾组织纤维化程度

将 4%多聚甲醛固定的肾组织石蜡包埋,切成 4 μ m 切片行 Masson 染色,显微镜下观察,高倍视野下($\times 400$),Masson 染色胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色,蓝染的间质胶原纤维越多,表示肾纤维化越严重。Image-ProPlus 6.0 分析蓝染区域所占面积比,实验结果用阳性面积百分率(Per Area Obj/Total)表示。

1.5 免疫组织化学染色检测各组肾组织 α -SMA 和 Collagen I 的表达

组织切片,依次脱蜡、水化及抗原修复后,3%过氧化氢室温孵育 15 min,正常山羊血清封闭 30 min,分别滴加 α -SMA(1:100),Collagen I (1:150),4℃孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。辣根过氧化物酶标记二抗室温下孵育 10 min,PBS 摇床漂洗,DAB 染色后用蒸馏水冲洗 2 次终止反应,细胞核复染,梯度脱水后用中性树胶封片,显微镜下观察,高倍视野($\times 400$)肾间质内可见棕黄色条索、波纹状染色为阳性表达。Image-Pro Plus 6.0 分析 α -SMA 和 Collagen I 阳性表达区域所占面积,实验结果用阳性面积百分率(Per AreaObj/Total)表示。

1.6 Western blot 检测各组肾组织 α -SMA、Collagen I、E-cadherin、TGF- β_1 和 p-Smad3 的表达

将肾组织剪碎研磨,加蛋白裂解液提取细胞蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,提取的蛋白置于 100℃恒温器变性 10 min。每孔 20 μ g 蛋白的上样量经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下 5%脱脂奶粉封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次后放入相应的一抗中,4℃孵育过夜。次日取出,TBST 清洗 3 次后放入二抗中,避光常温孵育 1 h,利用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫膜。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

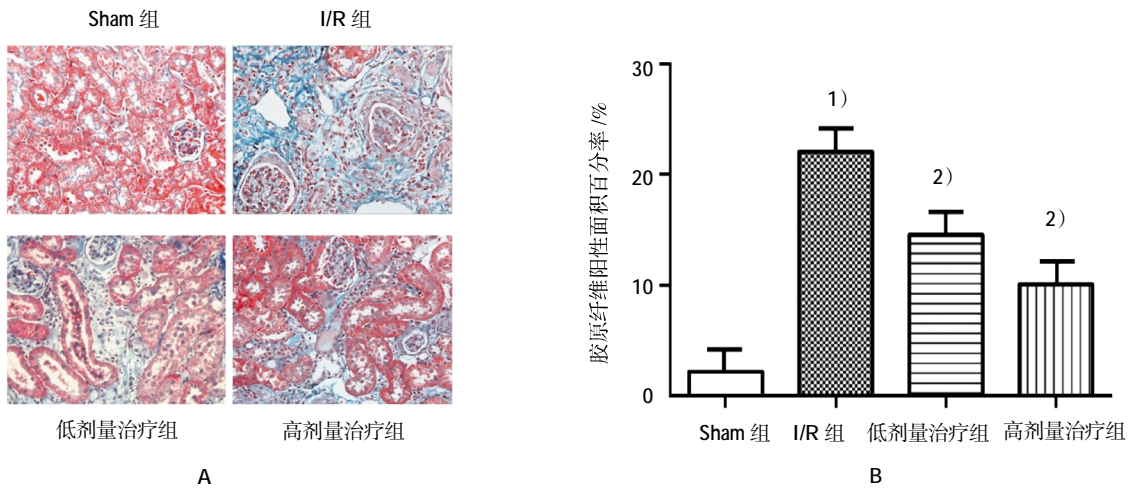
2.1 五味子乙素减轻 I/R 小鼠模型肾损伤

Masson 染色结果显示: Sham 组肾小球, 肾小管形态、大小均正常, 肾间质仅肾小球系膜及基底膜、肾小管基底膜及脉管区有蓝色表达区域, 未见纤维增生; I/R 组术后 10 周, 可见肾间质萎缩和坏死, 间质大量炎症细胞浸润, 蓝染区域较 Sham 组增多, 肾间质纤维化严重; 五味子乙素治疗组与 I/R 组比较, 肾

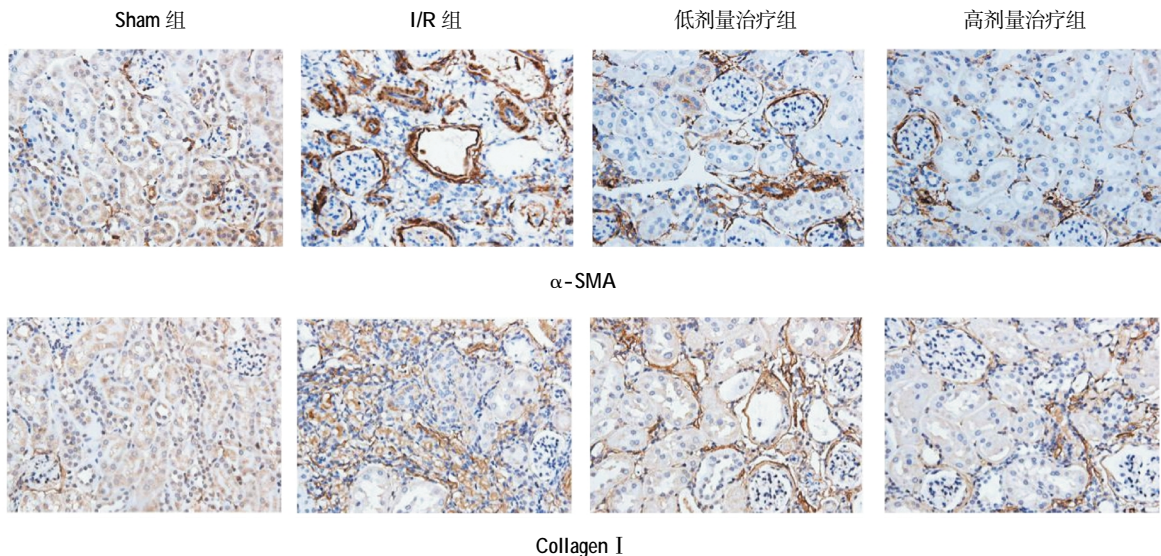
损伤程度减轻, 胶原蓝染面积减少(见图 1A)。各组胶原纤维阳性面积, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=201.584, P=0.000$)。两两比较用 LSD-*t* 检验, I/R 模型组较 Sham 组胶原纤维阳性面积增多 ($P=0.000$); 治疗组与 I/R 组比较, 胶原纤维阳性面积减少(均 $P=0.000$)。见图 1B。

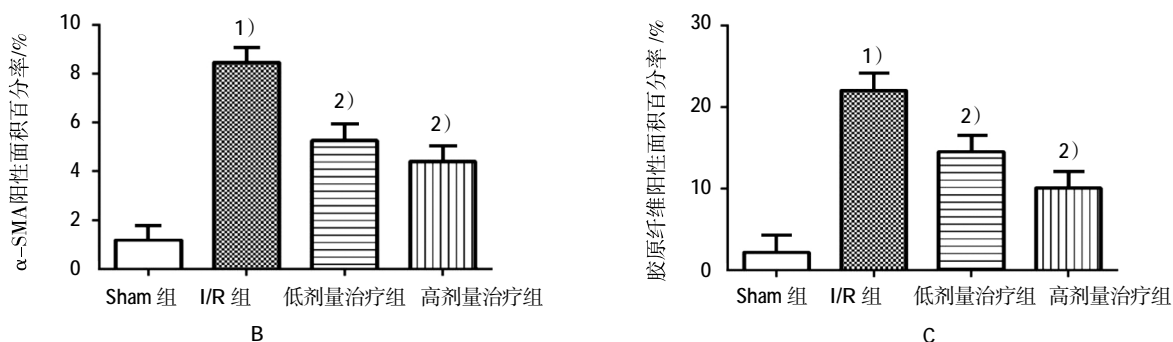
2.2 五味子乙素调节 I/R 模型小鼠肾组织 α -SMA 和 collagen I 的表达

各组小鼠肾组织 α -SMA 和 Collagen I 的表达水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=90.850$ 和 148.818 , 均 $P=0.000$)。Sham 组肾组织 α -SMA 和 Collagen I 表达较少, I/R 组表达较 Sham 组增高(均 $P=0.000$)。五味子乙素治疗组 α -SMA 和 Collagen I 表达较 I/R 组均减少(均 $P=0.000$),



A: 各组小鼠肾组织 Masson 染色; B: 各组小鼠肾组织胶原纤维阳性面积百分率柱状图。1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 I/R 模型组比较, $P < 0.05$
图 1 五味子乙素治疗 I/R 模型小鼠的肾组织染色结果 (Masson 染色 $\times 400$)





A: 各组小鼠肾组织 α-SMA 和 Collagen I 的表达; B, C: α-SMA 和 Collagen I 阳性面积百分率柱状图。1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 I/R 组比较, $P < 0.05$

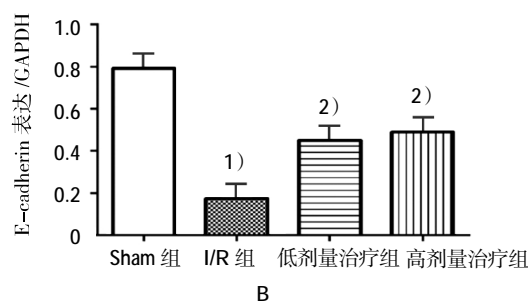
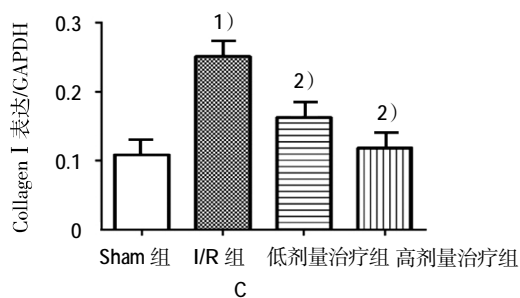
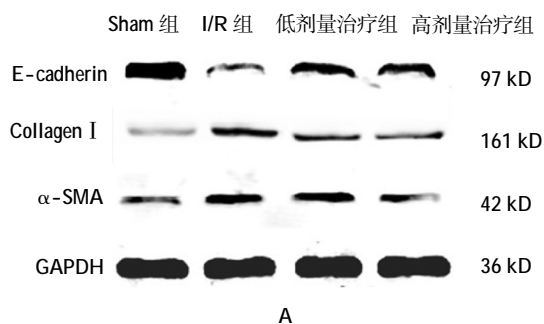
图 2 五味子乙素调节 I/R 模型小鼠肾组织 α-SMA 和 Collagen I 的表达 (免疫组织化学法 × 400)

高剂量组治疗效果比低剂量组好。见图 2。

2.3 各组小鼠肾组织 α-SMA、Collagen I 和 E-cadherin 的表达

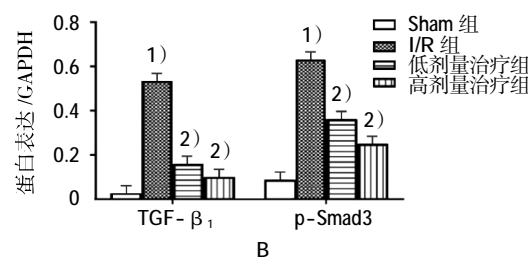
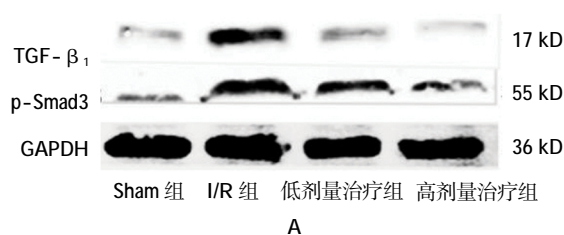
术后 10 周, 各组小鼠肾组织 α-SMA、Collagen I 和 E-cadherin 蛋白相对表达水平比较, 经单因素

方差分析, 差异有统计学意义 ($F=67.201, 85.092$ 及 166.843 , 均 $P=0.000$)。与 Sham 组比较, I/R 组 α-SMA 和 Collagen I 表达量增高(均 $P=0.000$), 与 I/R 组比较, 治疗组 α-SMA 和 Collagen I 表达量减少(均 $P=0.000$), 且高剂量治疗组表达量减少。上皮



A: 各组小鼠肾组织 α-SMA、Collagen I 和 E-cadherin 的表达; B, C, D: 各组小鼠肾组织 α-SMA、Collagen I 和 E-cadherin 相对表达量柱状图。1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 I/R 组比较, $P < 0.05$

图 3 各组小鼠肾组织 α-SMA、Collagen I 和 E-cadherin 的表达



A: 各组小鼠肾组织中 TGF-β₁ 和 p-Smad3 的表达; B: 各组小鼠肾组织 TGF-β₁ 和 p-Smad3 相对表达量柱状图。1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 I/R 组比较, $P < 0.05$

图 4 各组小鼠肾组织 TGF-β₁ 和 p-Smad3 的表达

特征蛋白 E-cadherin I/R 组表达量较 Sham 组减少 ($P=0.000$), 治疗组表达量比 I/R 组增高(均 $P=0.000$)。见图 3。

2.4 各组小鼠肾组织 TGF- β_1 /p-Smad3 的表达

各组小鼠肾组织 TGF- β_1 /p-Smad3 蛋白相对表达水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=245.580$ 和 175.083 , 均 $P=0.000$)。Sham 组 TGF- β_1 和 p-Smad3 无表达, I/R 模型组表达较多(均 $P=0.000$), 治疗组较 I/R 组表达量减少(均 $P=0.000$)。见图 4。

3 讨论

肾间质纤维化是慢性终末期肾病的主要病理变化, 也是各种慢性肾病的最终结果^[1,4]。IRI 病理变化是急性肾小管凋亡和坏死, 是 AKI 的主要原因。肾脏发生缺血损伤后其功能可恢复正常, 但成纤维细胞大量增殖、细胞外基质过度沉积, 导致肾小管间质纤维化, 最终进展为 CKD^[9]。EMT 是肾间质纤维化的一个重要因素, 包括上皮标志物的缺失如 E-cadherin 以及间质指标的增多, 如 α -SMA 和 Collagen I 等^[9]。虽然输尿管梗阻是建立小鼠肾纤维化模型的传统方式, 但临床上由输尿管梗阻导致的肾纤维化发生率较低^[10], 而缺血再灌注损伤与临床联系紧密, AKI 与 CKD 的病理相关性最近也已明确澄清, AKI 患者比有 CKD 病史的患者更容易发生终末期肾脏病^[11]。小鼠肾缺血再灌注模型十分契合急性肾损伤发展为慢性肾损伤的过程^[11-13]。

TGF- β_1 调节细胞生长、纤维化和炎症, 在正常或损伤组织重塑中起着至关重要的作用, TGF- β_1 的异常调节常导致病理纤维化的细胞增殖和细胞外基质蛋白的过度积累^[14-15]。TGF- β_1 是最重要的促肾纤维化因子, 研究表明 TGF- β_1 在激活下游 Smad 信号调节肾小管间质纤维化中起着重要作用, 其机制可能是通过激活 TGF- β /Smad 信号途径实现^[9]。本实验 Western bolt 结果显示, 发生纤维化组织中 TGF- β_1 和 p-Smad3 蛋白的表达量会明升高。

五味子乙素是中药五味子的主要活性成分, 具有多种生物活性, 包括抗氧化、抗炎以及抗肿瘤作用, 对心、脑、肝和肾等多种器官均具有保护作用^[16]。五味子乙素通过靶向针对 TGF- β_1 , 对肿瘤、血管损伤和原发性肺动脉高压等均具有治疗作用^[17-18]。LEE 等^[19]研究发现, 五味子乙素还可抑制炎症和防止基质金属蛋白酶的降解, 对大鼠大脑缺血再灌注引起

的神经损伤也具有保护作用。本研究中, I/R 组 Masson 染色可见蓝染的胶原纤维增多, 间质炎症细胞浸润, 肾间质结构严重破坏, 肾小管明显萎缩和坏死; 免疫组织化学染色及 Western blot 检测间质指标蛋白 α -SMA 和 Collagen I, I/R 组表达较 Sham 组均升高, 说明本实验通过 I/R 成功构造肾纤维化模型。用五味子乙素作为治疗药物逆转肾纤维化, 从免疫组织化学及 Western blot 结果可以看出五味子乙素有治疗作用, 五味子乙素通过抑制 TGF- β_1 的表达, 进而抑制 p-Smad3 的表达。

综上所述, 在小鼠肾缺血再灌注损伤模型中, 五味子乙素具有抗肾纤维化作用, 其机制可能是通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路, 抑制细胞外基质堆积和上皮间质转化, 从而减轻肾缺血再灌注损伤引起的肾小管间质纤维化, 并提示五味子乙素有望成为抗肾纤维化的临床治疗药物, 为肾纤维化的防治提供新的思路和途径。

参 考 文 献:

- [1] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. Lancet, 2013, 382(9888): 260-272.
- [2] WEBSTER A C, NAGLER E V, MORTON R L, et al. Chronic kidney disease[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1238-1252.
- [3] CHAWLA L S, EGGERS P W, STAR R A, et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes-NEJM[J]. New England Journal of Medicine. 2014, 371(1): 58-66.
- [4] ZHANG L, WANG F, WANG L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. Lancet, 2012, 379(9818): 815-822.
- [5] CAREW R M, WANG B, KANTHARIDIS P. The role of EMT in renal fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 103-116.
- [6] PARK E J, CHUN J N, KIM S H, et al. Schisandrin B suppresses TGF-beta 1 signaling by inhibiting Smad2/3 and MAPK pathways[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(3): 378-384.
- [7] 闫荟羽, 周微, 曲晓宇, 等. 五味子乙素的药理研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(2): 153-156.
- [8] INOUE T, UMEZAWA A, TAKENAKA T, et al. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models[J]. Kidney Int, 2015, 87(1): 233-238.
- [9] WANG L, CAO A L, CHI Y F, et al. You-gui pill ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via inhibition of TGF-beta/Smad signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 169(3): 229-238.
- [10] LIM B J, YANG H C, FOGO A B. Animal models of regression/progression of kidney disease[J]. Drug Discov Today Dis Models, 2014(11): 45-51.
- [11] CAMPBELL D, WEIR M R. Defining, treating, and understand-

- ing chronic kidney disease—a complex disorder[J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2015, 17(7): 514-527.
- [12] SKRYPNYK N I, HARRIS R C, de CAESTECKER M P. Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2013 (78): e50495.
- [13] NOGUEIRA A, PIRES M J, OLIVEIRA P A. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: a review of animal models and therapeutic strategies[J]. *In Vivo*, 2017, 31(1): 1-22.
- [14] SHAN G, ZHOU X J, XIA Y, et al. Astragalus membranaceus ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting tubular epithelial-mesenchymal transition in vivo and in vitro[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(5): 1611-1616.
- [15] WANG Y, LE Y, XUE J Y, et al. Let-7d miRNA prevents TGF- β 1-induced EMT and renal fibrogenesis through regulation of HMGA2 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(4): 676-682.
- [16] LIU Z, ZHANG B, LIU K, et al. Schisandrin B attenuates cancer invasion and metastasis via inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40480.
- [17] CHUN J N, KIM S Y, PARK E J, et al. Schisandrin B suppresses TGF- β 1-induced stress fiber formation by inhibiting myosin light chain phosphorylation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(2): 364-371.
- [18] WU J, JIA J, LIU L, et al. Schisandrin B displays a protective role against primary pulmonary hypertension by targeting transforming growth factor beta 1[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2017, 11(3): 148-157.
- [19] LEE T H, JUNG C H, LEE D H. Neuroprotective effects of schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in sprague-dawley rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(12): 4239-4245.

(王荣兵 编辑)