

三七总皂甙通过 Smads 信号通路减缓慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化进程的作用研究

高洁, 刘益涛, 董华, 王雅宁, 常相帝(滨州医学院附属医院肾内科, 山东 滨州 256603)

摘要: **目的** 探讨三七总皂甙(panax notoginseng saponins, PNS)通过 Smads 信号通路减缓慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)大鼠肾间质纤维化进程的作用。**方法** 60 只大鼠随机留取 10 只设为假手术组, 其余 50 只采用 5/6 肾切除术复制 CRF 模型, 将建模成功的 44 只大鼠随机分为慢性肾衰竭组、尿毒清组、三七总皂甙低剂量组(LPNS 组)、三七总皂甙高剂量组(HPNS 组), 每组 11 只。尿毒清组灌胃 $2.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的尿毒清溶液, 三七总皂甙低剂量组和三七总皂甙高剂量组灌胃 25、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的三七总皂甙溶液, 假手术组和慢性肾衰竭组灌胃等量生理盐水溶液, 连续 4 周。干预结束后, 检测各组肾功能指标: 血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、24 h 尿蛋白, HE 和 Masson 染色观察残余肾组织病理学改变及肾组织纤维化面积占比, RT-qPCR 和 Western Blot 法检测残余肾组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、Smad2/3、Smad6 mRNA 表达量及 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad6 蛋白表达量。**结果** 与慢性肾衰竭组比较, 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白水平均降低, 三七总皂甙高剂量组低于三七总皂甙低剂量组和尿毒清组(均 $P < 0.05$)。HE 染色显示, 慢性肾衰竭组可见肾小球、肾小管明显病变, 肾间质纤维化增生, 大量炎性细胞浸润; 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组上述病变减轻, 其中三七总皂甙高剂量组病变最轻。与慢性肾衰竭组比较, 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组肾组织纤维化面积占比、TGF- $\beta 1$ mRNA 相对表达量及 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad2/3 蛋白相对表达量均降低, 三七总皂甙高剂量组低于三七总皂甙低剂量组和尿毒清组(均 $P < 0.05$)。与慢性肾衰竭组比较, 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组 Smad6 mRNA 和蛋白相对表达量升高, 三七总皂甙高剂量组高于三七总皂甙低剂量组和尿毒清组(均 $P < 0.05$)。**结论** 三七总皂甙可有效减缓慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化进程, 可能通过抑制 Smad2/3 磷酸化水平, 激活 Smad6 发挥调控作用。

关键词: 慢性肾衰竭; 肾间质纤维化; 三七总皂甙; Smads 信号通路; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0799-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.008

Panax Notoginseng Saponins Reduce Renal Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Failure Rats Through Smads Pathway

GAO Jie, LIU Yitao, DONG Hua, WANG Yaning, CHANG Xiangdi (Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603 Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of panax notoginseng saponins (PNS) on the process of renal interstitial fibrosis in chronic renal failure (CRF) rats through Smads signaling pathway. **Methods** Ten of 60 rats were randomly selected as sham operation group, and the remaining 50 rats were performed 5/6 nephrectomy to prepare CRF model. 44 rats were successfully modeled and randomly divided into CRF group, *Niaoduqing* group, and PNS low-dose group(LPNS group), PNS high-dose group(HPNS group), each with 11 rats. *Niaoduqing* group

收稿日期: 2020-10-29

作者简介: 高洁, 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 慢性肾脏病的诊治及肾脏替代治疗。Email: gaojie_2050@163.com。通信作者: 常相帝, 女, 主治医师, 研究方向: 慢性肾脏病的诊治。Email: wang_669li@163.com。

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0048)。

was given intragastrically with $2.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Niaoduqing* solution, LPNS group and HPNS group were given 25, 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS solution, sham operation group and CRF group were given the same amount of physiological saline solution for 4 consecutive weeks. After intervention, the renal function indexes of each group, including blood creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN) and 24 h urine protein were detected. The pathological changes of residual renal tissue and the area ratio of renal tissue fibrosis were detected by HE and Masson staining. Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Smad2/3, Smad6 mRNA expression and TGF- $\beta 1$, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad6 protein expression in residual kidney tissue were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** Compared with the CRF group, the Scr, BUN, and 24-hour urine protein levels in the *Niaoduqing* group, LPNS group and HPNS group were low. The levels mentioned above in the HPNS group were lower than in the LPNS group and the *Niaoduqing* group ($P < 0.05$). HE staining showed that there were obvious glomerular and renal tubule lesions, renal interstitial fibrosis and proliferation, and a large number of inflammatory cell infiltration in the CRF group. The above-mentioned lesions in the *Niaoduqing* group, LPNS group, and HPNS group were alleviated, and the lightest lesions were found in the HPNS group. Compared with the CRF group, the area ratio of renal tissue fibrosis, the relative expression of TGF- $\beta 1$ mRNA, TGF- $\beta 1$ and p-Smad2/3 protein in the *Niaoduqing* group, LPNS group and HPNS group were low, and the indexes mentioned above in the HPNS group were lower than in the LPNS group and the *Niaoduqing* group ($P < 0.05$). Compared with the CRF group, the relative expression of Smad6 mRNA and protein in the *Niaoduqing* group, LPNS group and HPNS group was high, and the expression in the HPNS group was higher than in the LPNS group and *Niaoduqing* group ($P < 0.05$). **Conclusion** PNS can effectively slow down the process of renal interstitial fibrosis in CRF rats and play a regulatory role by inhibiting the phosphorylation of Smad2/3 and activating Smad6.

Keywords: Chronic renal failure; renal interstitial fibrosis; panax notoginseng saponins; Smads signaling pathway; rats

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是多种肾脏疾病发展到终末阶段的结果,此时肾脏不能维持其基本功能,表现为全身代谢功能紊乱,全身多系统受累,预后多不良^[1]。研究认为,肾间质纤维化是多种慢性肾脏疾病发生、发展的共同途径,是引起肾结构和功能障碍的重要原因之一^[2-3]。因此,寻找有效药物干预或延缓肾间质纤维化进程,对缓解慢性肾衰竭进展、改善预后具有重要意义。

三七总皂甙(panax notoginseng saponins, PNS)是从中草药三七干燥根部提取的天然活性成分,具有增强机体免疫力、控制血压、改善微循环等多种药理学作用^[4]。近年来,三七总皂甙在心脑血管病^[5]及慢性肾病^[6]领域的作用取得广泛关注。Zhang 等^[7]研究证实,三七总皂甙具有肾脏保护作用,可有效抑制肾脏纤维化进程。目前,关于三七总皂甙肾保护及肾间质纤维化抑制作用已有报道^[8],但其具体调控机制仍未完全阐明。

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)是与肾间质纤维化密切相关的细胞因子,

Smads (small mother against decapentaplegic) 信号通路是 TGF- $\beta 1$ 促纤维化的中心环节^[9]。为此,本研究通过观察三七总皂甙对慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化进程的抑制作用,并从 Smads 信号通路探讨其可能的调控机制,以期为临床慢性肾衰竭的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只健康 SPF 级雄性 SD 大鼠,7 周龄,体质量 220~240 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(浙)2019-0001,动物质量合格证号:440021310159490。动物饲养于烟台拉斐尔生物科技有限公司,使用许可证号:SYXK(鲁)2017-0026。

1.2 主要药物及试剂 尿毒清颗粒,广州康臣药业有限责任公司,批号:20190317;三七总皂甙,湖南华纳大药厂股份有限公司,浓度 $\geq 85\%$,批号:20181220;逆转录试剂盒,日本 Takara 公司,批号:RR047A;兔抗大鼠 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3、

Smad6 单抗, 山羊抗兔 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad6 抗体, 均购自美国 Abcam 公司, 批号分别为: ab124894、ab207447、ab63672、ab226872、ab179695、ab217553、ab232326、ab114358; BCA 蛋白定量分析试剂盒, 美国 Thermo 公司, 批号: SJ216840; 电化学(electrochemistry, ECL)发光试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: SW2010。

1.3 仪器 AU5800 型全自动生化分析仪、IchemVELOCITY 全自动尿液分析仪, 美国 BeckMan Coulter 公司; CX42 型光学显微镜, 日本 Olympus 公司; 1-16 型离心机, 德国 SIGMA 公司; 7500 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; CheniDoc XRS 型化学发光成像分析系统, 美国 Bio-rad 公司。

1.4 慢性肾衰竭模型大鼠的建立 采用 5/6 肾切除术进行慢性肾衰竭模型复制^[10]。以 6 mL·kg⁻¹ 体质量腹腔注射 1% 戊巴比妥那麻醉大鼠, 俯卧位固定后, 常规消毒备皮, 左侧肋角做 2 cm 切口, 逐层分离肌肉, 暴露左肾, 分离肾包膜, 结扎上、下极, 切除 2/3 肾组织, 明胶海绵压迫出血, 确认无出血后复位左肾, 逐层缝合切口。术后按每公斤体质量 72 万单位腹腔注射青霉素, 连续 3 d。1 周后再次手术摘除右肾, 操作步骤同前。术后分笼饲养, 4 周后尾静脉采血检测血肌酐(Serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平, 以血肌酐、尿素氮水平大于健康大鼠的 2 倍, 表明模型复制成功。

1.5 分组及干预 60 只大鼠随机留取 10 只设为假手术组, 仅做双肾被膜剥离术; 其余 50 只采用 5/6 肾切除术复制慢性肾衰竭模型, 将建模成功 44 只大鼠随机分为慢性肾衰竭组、尿毒清组、三七总皂甙低剂量组(LPNS 组)、三七总皂甙高剂量组(HPNS 组), 每组 11 只。术后 4 周即慢性肾衰模型复制成功后, 开始干预。根据人与大鼠体表面积换算公式计算, 大鼠尿毒清颗粒临床等效剂量为 2.2 g·kg⁻¹, 三七总皂甙临床等效剂量为 25 mg·kg⁻¹。尿毒清组: 每只大鼠以 10 mL·kg⁻¹ 灌胃 2.2 g·kg⁻¹ 的尿毒清溶液(尿毒清颗粒溶于生理盐水); 三七总皂甙低剂量组和三七总皂甙高剂量组: 每只大鼠以 10 mL·kg⁻¹ 灌胃 25、100 mg·kg⁻¹ 的三七总皂甙溶液, 假手术组和慢性肾衰竭组, 每只大鼠以 10 mL·kg⁻¹ 灌胃生理盐水溶液。每天灌胃 1 次, 连续 4 周。

1.6 标本采集 末次给药后, 各组大鼠放于代谢笼取 24 h 尿液, 称质量, 于 4 ℃、3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min

(离心半径 12 cm), 取上清液置于 -20 ℃ 备用; 3% 戊巴比妥钠麻醉后, 进行腹主动脉采血 5 mL, 于 4 ℃ 静置 2 h 后, 以 4 ℃ 预冷离心机 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 12 cm), 取上层血清置于 -20 ℃ 备用。采血后, 每组取 5 只大鼠的残余肾组织, 放于 40% 中性甲醛中固定 48 h 备用; 另取 5 只大鼠的残余肾组织, 放于 -80 ℃ 保存备用。

1.7 检测指标

1.7.1 肾功能指标检测 取保存于 -20 ℃ 的血清和尿液, 采用全自动生化分析仪及配套试剂盒检测血肌酐、尿素氮水平; 采用尿液分析仪检测尿液中尿蛋白水平; 根据 24 h 尿液总体积计算 24 h 尿蛋白水平。

1.7.2 肾组织 HE 染色和 Masson 染色 取 40% 中性甲醛中固定的肾组织, 修剪为 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm 大小, 经酒精脱水、石蜡包埋后, 制作厚度为 4 μ m 的连续切片。每只大鼠取 5 张切片, 进行常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 光学显微镜下观察拍照, 观察残余肾组织病理学改变。每只大鼠另取 5 张切片, 进行常规 Masson 染色, 光学显微镜下观察拍照。以蓝色胶原沉淀为阳性信号, 应用 ImageJ 图像分析软件进行半定量分析, 计算肾间质胶原纤维沉淀面积占视野内肾小管间质总面积的百分比, 即肾间质纤维化面积占比。

1.7.3 肾组织 TGF- β 1、Smad2/3、Smad6 mRNA 表达量检测 取 -80 ℃ 保存的残余肾组织, 以 TRIzol 法提取总 RNA, 反转录获得互补链 cDNA, 产物经凝胶电泳鉴定、浓度测定后, 以 cDNA 为模板链, 进行实时荧光定量聚合酶链反应。按照试剂盒设定反应体系, 反应条件为 95 ℃ 预变性 4 min; 95 ℃ 变性 25 s, 60 ℃ 退火 60 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 共 42 个循环。以 β -actin 为内参对照, 按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 TGF- β 1、Smad2/3、Smad6 相对表达强度。实验引物由上海生工生物工程股份有限公司设计和合成。引物序列: TGF- β 1 为 F: 5'-CTAGTGCTATGCTGACTGC-3', R: 5'-ATGCTGTAGCTGTAGCTGC-3'; Smad2/3 为 F: 5'-CTGCTGATGCTGATGCTGC-3', R: 5'-AGTAGTGCTGATGCTGATGCTG-3'; Smad6 为 F: 5'-CGTGATGTGATGCTGATC-3', R: 5'-GTAGTGCTGTAGTCCTGA-3'; β -actin 为 F: 5'-TGATGCTGTAGTGCTGATGCT-3', R: 5'-GTAGTCGTAGCTGATGCTGCC-3'。

1.7.4 肾组织 TGF- β 1、Smad2/3、Smad6 蛋白表达量检测 取 -80 ℃ 保存的残余肾组织, 液氮中研磨, 加

入细胞裂解液于冰上孵育 20 min, 以 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min(离心半径 12 cm), 取上清液置于沸水水浴 10 min。以 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 再次离心 20 min(离心半径 12 cm), 取上清液进行 BCA 蛋白浓度测定, 取 $60\text{ }\mu\text{g}$ 样品进行 SDS-PAGE 电泳; 经电转转膜、封闭液封闭 2 h 后, 加入稀释一抗(1:500), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤后, 加入稀释二抗(1:5 000), 常温孵育 2 h。进行 ECL 电化学发光法显色, 应用凝胶成像系统扫描, 采用 ImageJ 图像分析软件进行灰度值分析, TGF- β 1、Smad2/3、Smad6 蛋白相对表达量以目的蛋白与内参 β -actin 的灰度值比值表示。

1.8 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 软件处理数据, 符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本计量资料比较, 先进行方差齐性 Levene 检验, 若方差齐, 采用单因素方差分析进行总均值比较, 有统计学差异的采用 SNK- q 法进行两两比较; 若方差不齐, 采用 Welch 检验进行总均值比较, 有统计学差异的再采用 Dunnett T_3 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 实验期间, 假手术组的活动、摄食等一般情况均无异常; 慢性肾衰竭组建模期间毛发无光泽, 喜卧, 摄食减少, 饮水增加, 体质减轻, 尿量增多, 部分出现尾巴红肿溃烂, 四肢水肿情况; 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三

七总皂甙高剂量组干预后, 上述情况均有所好转, 其中三七总皂甙高剂量组好转最为明显。

2.2 各组肾功能指标比较 见表 1。与假手术组比较, 慢性肾衰竭组血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白水平均较高($P < 0.05$); 与慢性肾衰竭组比较, 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白水平均较低($P < 0.05$); 三七总皂甙高剂量组低于三七总皂甙低剂量组和尿毒清组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 三七总皂甙低剂量组与尿毒清组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组肾组织 HE 染色结果 见图 1。HE 染色结果显示, 假手术组肾组织结构基本正常, 无炎性细胞浸润; 慢性肾衰竭组可见肾小球明显萎缩, 肾小管内有结晶物质, 可见蛋白管型, 肾间质纤维化增生, 且大量炎性细胞浸润; 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组上述病变减轻, 其中三七总皂甙高剂量组最轻。

2.4 各组肾组织 Masson 染色结果 见图 2。与假手术组比较, 慢性肾衰竭组纤维化面积占比均较高($P < 0.05$); 与慢性肾衰竭组比较, 尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组纤维化面积占比均较低($P < 0.05$); 三七总皂甙高剂量组低于三七总皂甙低剂量组和尿毒清组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 三七总皂甙低剂量组与尿毒清组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组肾功能指标比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of renal function indexes of each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	血肌酐/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	尿素氮/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	24 h 尿蛋白/($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)
假手术组	—	55.38 ± 8.50	8.06 ± 2.06	0.71 ± 0.20
慢性肾衰竭组	—	$126.37 \pm 10.24^*$	$42.57 \pm 3.95^*$	$13.49 \pm 1.08^*$
尿毒清组	$2.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$92.87 \pm 9.41^*$	$27.30 \pm 3.12^*$	$10.52 \pm 0.95^*$
三七总皂甙低剂量组	25	$91.90 \pm 9.26^*$	$27.48 \pm 3.06^*$	$10.34 \pm 0.94^*$
三七总皂甙高剂量组	100	$82.36 \pm 9.58^{*\Delta\Delta}$	$19.34 \pm 2.38^{*\Delta\Delta}$	$8.05 \pm 0.78^{*\Delta\Delta}$

注: 与假手术组比, $^*P < 0.05$; 与慢性肾衰竭组比, $^*P < 0.05$; 与尿毒清组比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与三七总皂甙低剂量组比, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

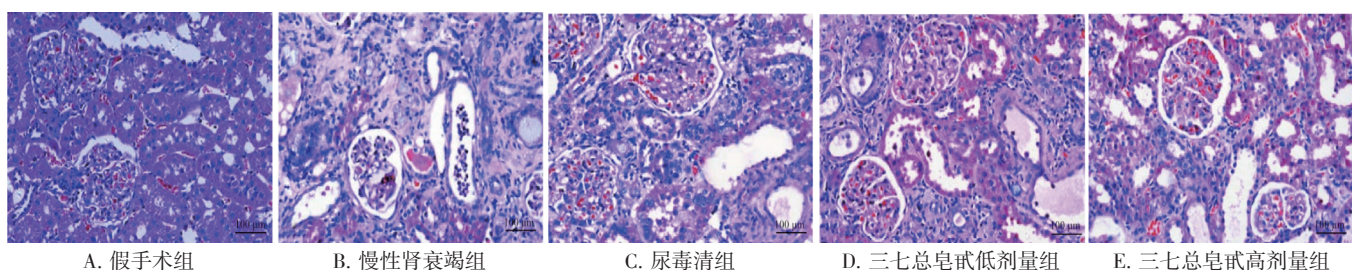
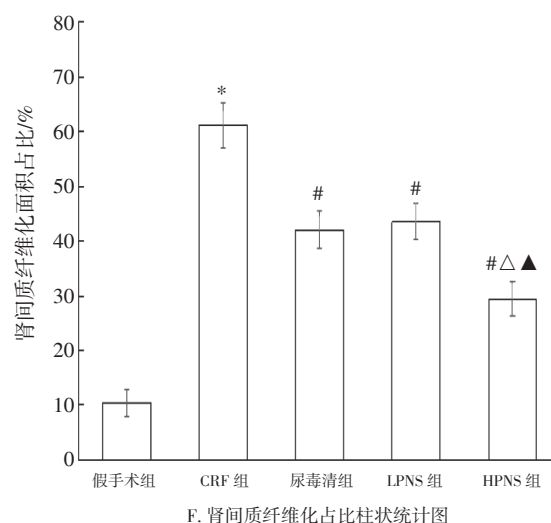
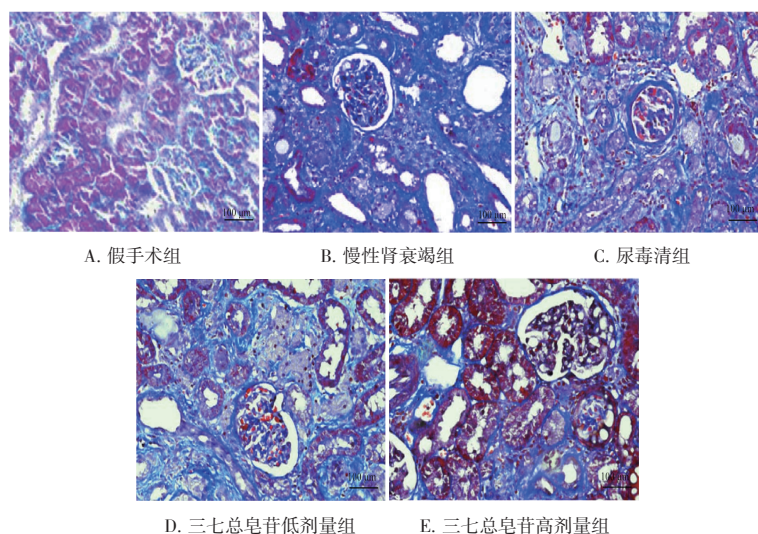


图 1 各组肾组织 HE 染色($\times 200$)

Figure 1 HE staining of kidney tissue in each group($\times 200$)



注：CRF 组，慢性肾衰竭组；LPNS 组，三七总皂苷低剂量组；HPNS 组，三七总皂苷高剂量组。与假手术组比，* $P < 0.05$ ；与慢性肾衰竭组比，* $P < 0.05$ ；与尿毒清组比， $\Delta P < 0.05$ ；与三七总皂苷低剂量组比， $\Delta P < 0.05$

图 2 各组肾组织 Masson 染色($\times 200$)

Figure 2 Masson staining of kidney tissue in each group($\times 200$)

2.5 各组肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、Smad6 mRNA 表达量比较 见表 2。Smad2/3 mRNA 相对表达量组间比较的差异无统计学意义($P > 0.05$)。与假手术组比较，慢性肾衰竭组 TGF- $\beta 1$ mRNA 相对表达量升高、Smad6 mRNA 相对表达量降低(均 $P < 0.05$)。与慢性肾衰竭组比较，尿毒清组、三七总皂苷低剂量组、三七总皂苷高剂量组 TGF- $\beta 1$ mRNA 相对表达量降低($P < 0.05$)；三七总皂苷高剂量组低于三七总皂苷低剂量组和尿毒清组($P < 0.05$)。与慢性肾衰竭组比较，尿毒清组、三七总皂苷低剂量组、三七总皂苷高剂量组 Smad6 mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$)；三七总皂苷高剂量组高于三七总皂苷低剂量组和尿毒清组($P < 0.05$)。三七总皂苷低剂量组与尿毒清组 TGF- $\beta 1$ 、Smad6 mRNA 的相对表达量比较，差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、Smad6 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Comparison of relative expressions of TGF- $\beta 1$, Smad2/3 and Smad6 mRNA in renal tissue of each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF- $\beta 1$	Smad2/3	Smad6
假手术组	-	0.20 $\pm$ 0.04	1.05 $\pm$ 0.10	0.95 $\pm$ 0.09
慢性肾衰竭组	-	1.35 $\pm$ 0.09*	1.01 $\pm$ 0.09	0.20 $\pm$ 0.04*
尿毒清组	2.2 g·kg ⁻¹	0.95 $\pm$ 0.07#	1.04 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.05#
三七总皂苷低剂量组	25	0.93 $\pm$ 0.07#	1.06 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.06#
三七总皂苷高剂量组	100	0.47 $\pm$ 0.06# Δ Δ	1.02 $\pm$ 0.10	0.81 $\pm$ 0.07# Δ Δ

注：与假手术组比，* $P < 0.05$ ；与慢性肾衰竭组比，* $P < 0.05$ ；与尿毒清组比， $\Delta P < 0.05$ ；与三七总皂苷低剂量组比， $\Delta P < 0.05$

2.6 各组肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad6 蛋白表达量比较 见图 3、4。与假手术组比较，慢性肾衰竭组 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad2/3 蛋白相对表达量均升高，Smad6 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。与慢性肾衰竭组比较，尿毒清组、三七总皂苷低剂量组、三七总皂苷高剂量组的 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad2/3 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)；三七总皂苷高剂量组低于三七总皂苷低剂量组和尿毒清组($P < 0.05$)。与慢性肾衰竭组比较，尿毒清组、三七总皂苷低剂量组、三七总皂苷高剂量组 Smad6 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)；三七总皂苷高剂量组高于三七总皂苷低剂量组和尿毒清组($P < 0.05$)。三七总皂苷低剂量组和尿毒清组的 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad2/3、Smad6 蛋白相对表达量比较，差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

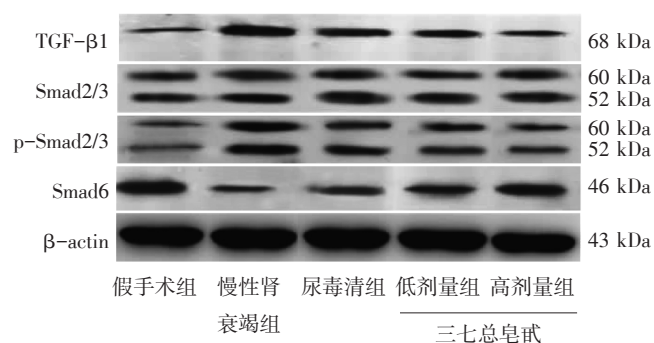
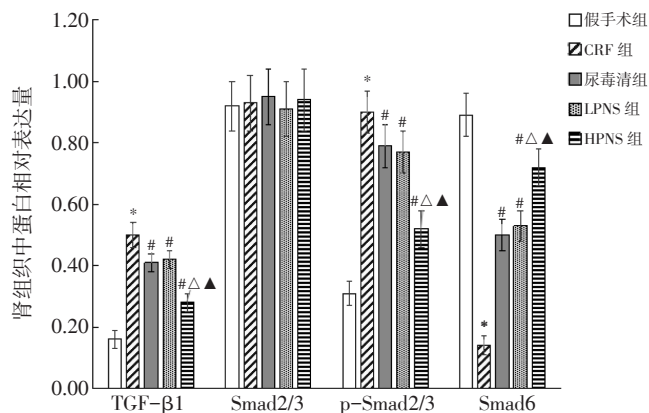


图 3 各组肾组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad6 蛋白免疫印记图

Figure 3 The immunoblot image of TGF- $\beta 1$, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad6 protein in renal tissue of each group



注：与假手术组比，* $P < 0.05$ ；与慢性肾衰竭(CRF)组比，# $P < 0.05$ ；与尿毒清组比， $\Delta P < 0.05$ ；与三七总皂甙低剂量(LPNS)组比， $\Delta P < 0.05$ 。HPNS 组，三七总皂甙高剂量组

图4 各组肾组织 TGF-β1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad6 蛋白相对表达量柱状统计图($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 4 Columnar statistics of the relative expressions of TGF-β1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad6 in renal tissue of each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3 讨论

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是临床常见的泌尿系统疾病，是多种慢性肾病的最终归宿。肾结构破坏，肾小球滤过率降低，水、电解质平衡紊乱是其主要表现，预后差^[11]。近年来，随着我国老龄化加剧，高血压、糖尿病等慢性病的发病率逐年升高，慢性肾衰竭发病率也逐年升高，给患者及其家庭带来沉重负担^[12]。目前慢性肾衰竭多采用对症治疗、透析或肾移植等方法治疗，尚无理想药物。肾间质纤维化是慢性肾衰竭进展的病理基础^[13]，抗纤维化治疗成为慢性肾衰竭研究的热点。激素、免疫抑制剂是西医常用治疗药物，但均有明显副作用，在有效抗肾间质纤维化的同时减少用药副作用十分重要^[14]。近年来研究^[15]表明，中药在延缓肾病进展、改善患者肾功能等方面具有巨大优势，寻找抗肾间质纤维化的中药或其有效活性成分，并探讨其作用的具体机制，有助于慢性肾衰竭的临床防治。

本研究发现，与慢性肾衰竭组比较，尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白水平及肾组织纤维化面积占比均降低，三七总皂甙高剂量组低于三七总皂甙低剂量组和尿毒清组。HE 染色显示，慢性肾衰竭组可见肾小球、肾小管明显病变，肾间质纤维化增生，大量炎性细胞浸润；尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组上述病变减轻，其中

三七总皂甙高剂量组最轻，提示三七总皂甙具有改善慢性肾衰竭大鼠肾功能、抑制肾间质纤维化的作用。中医学认为，肾间质纤维化属“癥积”范畴，“虚、痰、瘀、毒”是其中医致病机制，其中“痰阻、瘀血”是促进纤维化的结构基础，而“脾虚、溺毒”可加速病变进程^[16]。三七可活血祛瘀、通达脉络，三七总皂甙是其主要活性成分，可降脂、降糖、改善微循环、抗衰老等，药理作用广泛^[17-18]。此外，三七总皂甙的抗组织器官纤维化作用受到关注，席加喜等^[19]应用三七总皂甙治疗顺铂诱导的肾损伤大鼠，结果显示三七总皂甙对肾损伤大鼠肾功能具有改善作用，且可抑制促肾纤维化相关因子 TGF-β1、I 型胶原等的表达，说明三七总皂甙可抑制肾纤维化。贾卓雅等^[20]应用三七总皂甙治疗糖尿病心肌病大鼠，Masson 染色显示心肌胶原纤维化明显减少；吴朕等^[21]应用三七皂苷 R1 治疗肝纤维化大鼠，发现其可减轻四氯化碳诱导的肝纤维化。以上表明，三七总皂甙具有抗组织、器官纤维化作用。

TGF-β1 是目前已被证实的促纤维化因子，可刺激纤维细胞增殖并促进其产生胶原蛋白，抑制细胞外基质降解^[22]。Smads 是 TGF-β1 的下游调控因子，TGF-β1 与细胞膜上受体结合后，激活细胞浆内 Smad2/3 使其磷酸化激活，促进 TGF-β1 信号转入细胞核，发挥促纤维化作用。Smad6 是抑制性 Smads，可阻断 TGF-β1 信号的转导^[23-24]。Xu 等^[25]应用干细胞生长因子治疗单侧输尿管梗阻小鼠，并建立 p-Smad2/3 沉默小鼠模型，证实抑制 TGF-β1/Smads 信号通路可抑制肾间质纤维化进程。Gao 等^[26]研究显示，丹参酸 B 可通过下调 TGF-β1、Smad2/3 蛋白表达抑制心肌纤维化。以上说明，TGF-β1/Smads 信号通路的激活参与了组织纤维化进程。本研究发现，尿毒清组、三七总皂甙低剂量组、三七总皂甙高剂量组肾组织 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达量及 Smad2/3 磷酸化水平较慢性肾衰竭组降低，且三七总皂甙高剂量组降低最为明显，三七总皂甙低剂量组与尿毒清组无明显差异，而 Smad6 mRNA 和蛋白表达量结果相反，提示可能通过抑制 Smad2/3 磷酸化水平，激活 Smad6 发挥抑制肾间质纤维化作用。

综上所述，三七总皂甙可有效减缓慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化进程，可能通过调控 Smads 信号通路发挥调控作用，为三七总皂甙相关药物的临床应用提供了参考依据。

参考文献:

- [1] SELIGER S L. Hyperkalemia in patients with chronic renal failure[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2019, 34(3): 12-18.
- [2] WAASDORP M, DE ROOIJ D M, FLORQUIN S, et al. Protease-activated receptor-1 contributes to renal injury and interstitial fibrosis during chronic obstructive nephropathy[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1268-1279.
- [3] ZUO Z, HUANG P, JIANG Y, et al. Acupuncture attenuates renal interstitial fibrosis via the TGF β /Smad pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2267-2275.
- [4] XIE W, MENG X, ZHAI Y, et al. Panax notoginseng saponins: a review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 940.
- [5] 丁实, 赵学荣, 李宝群, 等. 三七总皂苷对局部脑缺血大鼠的神经保护作用研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(9): 58-60.
- [6] 侯凯健, 郑杰洪, 朱丹, 等. 三七总皂苷联合氨基胍治疗对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用及机制[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(8): 120-126.
- [7] ZHANG Y, CHI X, WANG Z, et al. Protective effects of Panax notoginseng saponins on PME-Induced nephrotoxicity in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116(1): 108-119.
- [8] 吴胜斌, 王应灯. 人参皂苷Rg1对肾间质纤维化大鼠肾组织肝细胞生长因子及转化生长因子- β 1的影响[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(5): 422-425.
- [9] YANG H Y, KIM K S, LEE Y H, et al. Dendropanax moribifera ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via TGF- β 1/Smads pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(4): 800-811.
- [10] 余柯娜, 麻志恒, 钟利平, 等. SD大鼠与C57小鼠5/6肾切除慢性肾功能衰竭模型的比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(8): 51-56, 90.
- [11] BATCHELOR E K, KAPITSINOU P, PERGOLA P E, et al. Iron deficiency in chronic kidney disease: updates on pathophysiology, diagnosis, and treatment[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(3): 456-468.
- [12] 顾乡, 方向华. 老年人慢性肾脏病诊断标准和分期以及流行病学研究现状[J]. *中华老年医学杂志*, 2016, 35(5): 556-559.
- [13] 傅淑霞, 杨林. 肾脏病诊疗和病理图解[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 52-53.
- [14] HA J T, NEUEN B L, CHENG L P, et al. Benefits and harms of oral anticoagulant therapy in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Intern Med*, 2019, 171(3): 181-189.
- [15] CHEN H Y, PAN H C, CHEN Y C, et al. Traditional Chinese medicine use is associated with lower end-stage renal disease and mortality rates among patients with diabetic nephropathy: a population-based cohort study[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 81-92.
- [16] 段小军, 谈平, 侯海晶, 等. 全国名老中医药专家杨霓芝教授治疗慢性肾衰竭经验[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(10): 205-207.
- [17] LIU M W, WEI R, SU M X, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on severe acute pancreatitis through the regulation of mTOR/Akt and caspase-3 signaling pathway by upregulating miR-181b expression in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 51-63.
- [18] ZHANG S, CHEN C, LU W, et al. Phytochemistry, pharmacology, and clinical use of Panax notoginseng flowers buds[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11): 2155-2163.
- [19] 席加喜, 张华君, 陈晓宇, 等. 三七总皂苷对顺铂致肾损伤大鼠肾组织纤维化的改善作用及对相关因子表达的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(8): 1037-1042.
- [20] 贾卓雅, 石凯行, 范彦芳, 等. 丹皮酚联合三七总皂苷对大鼠糖尿病心肌纤维化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 133-138.
- [21] 吴朕, 茹金, 樊楚明, 等. 三七皂苷R1保护四氯化碳诱导肝纤维化模型大鼠的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(26): 4213-4217.
- [22] 张钊, 刘英宇, 刘岩, 等. 硫氧环蛋白过氧化物酶-2对转化生长因子 β 1诱导的人胚肺成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2020, 38(1): 7-12.
- [23] MA T T, MENG X M. TGF- β /Smad and Renal Fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165(1): 347-364.
- [24] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292(1): 76-83.
- [25] XU J, YU T T, ZHANG K, et al. HGF alleviates renal interstitial fibrosis via inhibiting the TGF- β 1/SMAD pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7621-7627.
- [26] GAO H, BO Z, WANG Q, et al. Salvianic acid B inhibits myocardial fibrosis through regulating TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110(1): 685-691.

(编辑: 修春)