

基于 TGF- β 1/Smad 通路探讨红花黄色素对腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠的保护作用

魏丹丹¹, 莫楠², 朱星昊¹, 梁磊¹, 李闪闪¹, 刘湘花¹, 李真珍³, 吴宗耀⁴, 蒋士卿²(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000; 3. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450000; 4. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850000)

摘要: **目的** 观察红花黄色素对腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠的保护作用及其对转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/Smad 信号通路的影响。**方法** 采用腺嘌呤(250 mg·kg⁻¹)灌胃建立肾纤维化大鼠模型。将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、氯沙坦组(9 mg·kg⁻¹)及红花黄色素低、高剂量组(9、18 mg·kg⁻¹), 每组 10 只, 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 30 d。检测大鼠血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)含量; 采用 HE 和 Masson 染色法观察大鼠肾脏组织病理学变化; 采用 RT-qPCR 法检测大鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad4 及 Smad7 mRNA 表达情况; 采用免疫组化法及 Western Blot 法检测大鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad4 及 Smad7 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠血清 Cr、BUN 含量显著升高($P < 0.01$); 大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), Smad7 mRNA 及蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠血清 Cr、BUN 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 各给药组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$), Smad7 mRNA 及蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。各组大鼠肾脏组织中 Smad4 mRNA 及蛋白表达水平无明显变化($P > 0.05$)。**结论** 红花黄色素对腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠具有保护作用, 其机制可能与抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路有关。

关键词: 肾间质纤维化; 红花黄色素; TGF- β 1/Smad 信号通路; 肾功能; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)10-1437-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.10.004

Study on the Protective Effect of Safflower Yellow on Adenine Induced Renal Fibrosis Rats Based on TGF- β 1/Smad Pathway

WEI Dandan¹, MO Nan², ZHU Xinghao¹, LIANG Lei¹, LI Shanshan¹, LIU Xianghua¹, LI Zhenzhen³, WU Zongyao⁴, JIANG Shiqing²(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000 Henan, China; 3. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000 Henan, China; 4. Tibet University of Tibetan Medicine, Lhasa 850000 Tibet Autonomous Region, China)

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of safflower yellow on adenine induced renal fibrosis rats and its influence on the TGF- β 1/Smad signaling pathway. **Methods** A rat model of renal fibrosis was established by gavaging of 250 mg·kg⁻¹ of adenine. SD rats were randomly divided into normal control group, renal fibrosis model group, losartan group(9 mg·kg⁻¹), safflower yellow low and high dose groups(9, 18 mg·kg⁻¹), with 10 rats in each group. Gavage was given once a day for 30 consecutive days. The serum creatinine(Cr) and urea nitrogen(BUN) were measured. The histopathological changes of rats' kidney were observed by HE and Masson staining. RT-qPCR

收稿日期: 2020-10-28

作者简介: 魏丹丹, 女, 博士, 研究方向: 中医内科及肿瘤相关疾病的基础与临床研究。Email: 1617924593@qq.com。通信作者: 蒋士卿, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中医内科及肿瘤相关疾病的基础与临床研究。Email: jiangshiqing66@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(U1304803); 河南中医药大学科研苗圃工程项目(MP2020-01)。

method was used to detect the expression of TGF- β 1, Smad4 and Smad7 mRNA in rat kidney tissue; immunohistochemical method and Western Blot method were used to detect TGF- β 1, protein expression of Smad4 and Smad7 in rats' kidney tissue. **Results** Compared with the control group, the serum Cr and BUN levels in the model group were significantly increased ($P < 0.01$); the TGF- β 1 mRNA and protein expression levels in the rats' kidney tissue were significantly increased ($P < 0.05$), and Smad7 mRNA and protein expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum Cr and BUN levels of rats in each administration group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the expression levels of TGF- β 1 mRNA and protein in the kidney tissue of rats in each administration group were significantly reduced ($P < 0.05$), Smad7 mRNA and protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant change in the expression levels of Smad4 mRNA and protein in the kidney tissues of rats in each group ($P > 0.05$). **Conclusion** Safflor yellow has protective effect on adenine-induced renal interstitial fibrosis in rats, and its mechanism may be related to the inhibition of TGF- β 1/Smad signaling pathway.

Keywords: Renal interstitial fibrosis; safflor yellow; TGF- β 1/Smad signaling pathway; renal function; rats

肾纤维化(Renal fibrosis, RF)是一种临床常见的肾脏疾病,也是多种慢性肾病发展到终末期的共同病理改变,约占肾病死亡率的45%^[1]。肾纤维化的发生与肾小管上皮细胞活化和间质成纤维细胞增殖关系密切^[2],主要致病因素包括炎症细胞浸润、致纤维化因子激活、肾小管上皮细胞-肾间质肌成纤维细胞转分化,以及胶原纤维、纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)、细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)等通过上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)增生、堆积等^[3]。研究^[4-6]表明,转化生长因子(TGF) β 1/Smad、Wnt/ β -catenin、RAS、NF- κ B等多种信号通路参与并调控肾纤维化。在TGF- β 超家族中,TGF- β 1是一种多功能细胞因子,参与肾纤维化过程中的炎症反应、EMT和ECM沉积等。TGF- β 1的主要下游分子Smad2/3也参与了TGF- β 1诱导的EMT^[7]。TGF- β 1通过促进Smad2/3表达,抑制Smad7的表达来促进肾纤维化。目前,对于肾纤维化尚无特异性药物,临床主要采用促红细胞生成素、骨形成蛋白-7等抗EMT的药物和抗肾小管上皮细胞凋亡的药物进行治疗,但效果并不理想。中医药在肾纤维化的治疗方面具有独特优势。研究^[8]显示,中药单体、单味中药以及复方制剂在防治肾纤维化方面都具有良好的前景,可通过减轻氧化应激、炎症反应,调节免疫等改善肾纤维化程度。红花黄色素(Safflor yellow, SY)是从活血化瘀类中药红花中提取出来的一种天然色素,具有心肌保护、降血压、扩张血管、改善器官供血、抗凝血、抑制血栓生成、抗氧化及抗炎等多种药理活性^[9]。故本研究拟建

立腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠模型,基于TGF- β 1/Smad信号通路探讨红花黄色素对肾纤维化大鼠的保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物 4月龄雄性SD大鼠53只,SPF级,体质量200~250g,由河南省实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(豫)2015-0004。根据实验性质分笼饲养于河南中医药大学动物实验中心,一级环境条件下饲养,自由摄食饮水。本研究经河南中医药大学动物伦理委员会审核,伦理批准号:DWLL20180018。

1.2 药品及试剂 红花黄色素,浙江永宁药业股份有限公司,批号:1607228;氯沙坦钾片,浙江华海药业股份有限公司,批号:429001。肌酐(Cr,批号:C011-1-1)、尿素氮(BUN,批号:C013-1-1)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;兔SP试剂盒(批号:SP-9001)、DAB显色试剂盒(批号:ZLI-9017),北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠TGF- β 1(批号:bs-0086R)、Smad4(批号:bs-0585R)、Smad7(批号:bs-0566R)抗体,北京博奥森生物技术有限公司;腺嘌呤(Adenine),上海源叶生物科技有限公司,批号:S18009;多聚甲醛固定液,武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:G1101;苏木素染色液(批号:S2020)、伊红染色液(批号:S2030),上海尚宝生物有限公司。

1.3 主要仪器 MR-96TB型酶标仪,骋克仪器(上海)有限公司;YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织

摊片机、YD-B 型组织烤片机, 金华市科迪仪器设备有限公司; RM2235 型石蜡切片机, 德国 Leica 公司; D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机, 大龙兴创实验仪器(北京)有限公司; Stepone plus 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; CX23 型光学显微镜, 日本奥林巴斯公司; BV-2 型垂直电泳仪、BT-2 型转印电泳仪、MX-F 型涡旋混合器, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 6300 型化学发光仪, 上海勤翔科学仪器有限公司。

1.4 模型复制、分组及给药 大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机选择 10 只作为对照组, 其余作为造模组。造模组大鼠均灌胃腺嘌呤混悬液(250 mg·kg⁻¹), 每天 1 次, 连续 12 d 后, 改为隔日 1 次, 共造模 24 d。第 25 天, 随机选取 3 只大鼠腹腔注射氨基甲酸乙酯麻醉后, 腹主动脉采血检测 Scr、BUN 含量, 并随机对大鼠肾脏组织进行病理观察。Scr、BUN 水平大于正常值上限, 且光镜下肾脏组织切片显示肾间质纤维化、炎性细胞浸润, 提示腺嘌呤诱导肾纤维化大鼠模型复制成功^[10]。

将造模成功的 40 只大鼠随机分模型组、氯沙坦组(9 mg·kg⁻¹)和红花黄色素低、高剂量组(9、18 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。红花黄色素的成人用量为 100 mg·d⁻¹, 依据人和动物间按体表面积折算的大鼠等效剂量为 9 mg·kg⁻¹(相当于红花生药量 1.17 g·kg⁻¹)。各给药组大鼠按照上述剂量灌胃给药, 对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 30 d。

1.5 血清 Cr、BUN 含量测定 末次给药 24 h 后, 各组大鼠腹腔注射氨基甲酸乙酯麻醉, 腹主动脉取血, 以 3 000 r·min⁻¹(离心半径 10 cm)离心 10 min, 取血清, 分别按照试剂盒说明书步骤检测各组大鼠血清 Cr、BUN 含量。

1.6 肾脏组织病理形态学观察 各组大鼠解剖取肾脏组织, 生理盐水冲洗后, 以中性甲醛固定; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5 μm 厚度切片; 分别采用 HE 和 Masson 染色后, 将切片置于光学显微镜下观察肾脏组织病变情况。

1.7 RT-qPCR 法检测肾脏组织 TGF-β1、Smad4、Smad7 mRNA 的表达水平 取 100 mg 大鼠肾脏组织, 用液氮研磨后收集于 EP 管中, 加入 1 mL Trizol 试剂提取肾脏组织总 RNA, 检测 RNA 含量和纯度(A₂₆₀/A₂₈₀=1.8~2.0)。采用 Servicebio 逆转录试剂盒进行逆转录反应, 反应条件为: 42 ℃ 60 min, 70 ℃

5 min, 4 ℃ 保持。然后进行 PCR 反应, 反应体系 15 μL; 反应条件: 预变性 95 ℃ 10 min, 变性 95 ℃ 15 s, 退火 60 ℃ 1 min, 共 40 个循环。扩增反应后进行熔解曲线分析, 判断产物是否具有非特异性扩增, 分析扩增曲线, 计算 Ct 值; 以 GAPDH 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCt}法计算各组间 mRNA 表达水平差异, 正常组基因表达量设为 1; 实验重复 3 次。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

引物名称	引物序列	产物长度/bp
TGF-β1	Forward primer: 5'-CGCAACAACGCAATCTATGAC-3'	204
	Reverse primer: 5'-ACCAAGGTAACGCCAGGAA-3'	
Smad4	Forward primer: 5'-TTCCTCATGTGATCTATGCCCG-3'	291
	Reverse primer: 5'-TTGGTGGATGTTGGATGTTTG-3'	
Smad7	Forward primer: 5'-CTCCTTACTCCAGATACCCGATG-3'	144
	Reverse primer: 5'-CCCCAGGCTCCAGAAGAAGT-3'	
GAPDH	Forward primer: 5'-GGCACACTCAAGGCTGAGAATG-3'	138
	Reverse primer: 5'-ATGGTGGTGAAGACCCAGT-3'	

1.8 免疫组化法检测肾脏组织 TGF-β1、Smad4、Smad7 蛋白表达 肾脏组织病理切片经脱蜡、水化后, H₂O₂ 封闭, PBS 清洗; 柠檬酸盐缓冲液热修复, 滴加山羊血清封闭液, 室温孵育, 倾去液体; 分别滴加 TGF-β1、Smad4、Smad7 抗体(1:100), 4 ℃ 下孵育过夜; 以二抗(1:100)37 ℃ 下孵育 20 min; DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染 1~2 min, 盐酸乙醇分化, 自来水再次冲洗; 脱水、透明、封片、镜检。每只大鼠肾脏组织随机留取 3 张切片, 在显微镜(×200)下每张切片随机选取 3 个视野。棕黄色为阳性染色, 采用 Image Pro Plus 6.0 软件测定并计算各组的平均积分吸光度(IA)值。

1.9 Western Blot 法检测肾脏组织 TGF-β1、Smad4、Smad7 蛋白表达 取大鼠肾脏组织, 称定质量, 加入含有 PMSF 的 RIPA 裂解液(含有 1% 磷酸酶抑制剂: 1% PMSF), 匀浆后, 4 ℃ 下以 12 000 r·min⁻¹(离心半径 10 cm)离心 10 min, 上清液采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。加上样缓冲液和 RIPA 制备样品, 上样量 100 μg 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入一抗 [TGF-β1(1:1 000)、Smad4(1:1 000)、Smad7(1:1 000)、β-actin(1:1 000)兔抗单克隆抗体], 4 ℃ 下孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入二抗

[辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000)], 室温下孵育 30 min, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。采用 ECL 试剂盒显影、扫描。以 β -actin 为内参, 根据目的条带与内参的灰度值比值进行半定量分析。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验或 Dunnett's T3 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠血清 Cr、BUN 水平的影响 结果见表 2。与对照组比较, 模型组大鼠血清 Cr、BUN 水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠血清 Cr、BUN 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.2 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织病理学变化的影响 结果见图 1。HE 染色可见, 对照组大鼠肾小管结构排列整齐, 肾小球形态规则, 未见炎性细胞浸润; 模型组大鼠可见系膜增生, 肾小管扩张或萎缩, 肾小球硬化且形态不规则, 球囊

表 2 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠血清 Cr、BUN 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of safflower yellow on serum Cr and BUN levels in adenine induced renal fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Cr/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	BUN/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
对照组	-	97.82 \pm 4.03	6.39 \pm 0.99
模型组	-	419.44 \pm 7.52 ^{##}	8.48 \pm 0.49 ^{##}
氯沙坦组	9	109.43 \pm 5.63 ^{**}	7.05 \pm 1.04 ^{**}
红花黄色素低剂量组	9	110.01 \pm 7.15 ^{**}	7.27 \pm 0.32 [*]
红花黄色素高剂量组	18	98.64 \pm 3.94 ^{**}	7.09 \pm 0.28 ^{**}

注: 与对照组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05, ^{**}P < 0.01$

粘连, 纤维化组织增多, 间质增宽, 可见炎性细胞浸润。Masson 染色可见, 对照组大鼠肾小球无明显异常, 无系膜增生, 间质正常; 模型组大鼠肾脏组织可见系膜增厚, 阳性染色面积较对照组显著增加。病理取材时也观察到模型组大鼠的肾脏代偿性增大, 表面存在很多凸起。经红花黄色素和氯沙坦干预后, HE 染色和 Masson 染色均可见, 大鼠肾脏的纤维化组织和炎性细胞明显减少, 肾小管扩张或萎缩减轻, 病理变化较模型组显著改善, 且阳性染色面积明显减少。

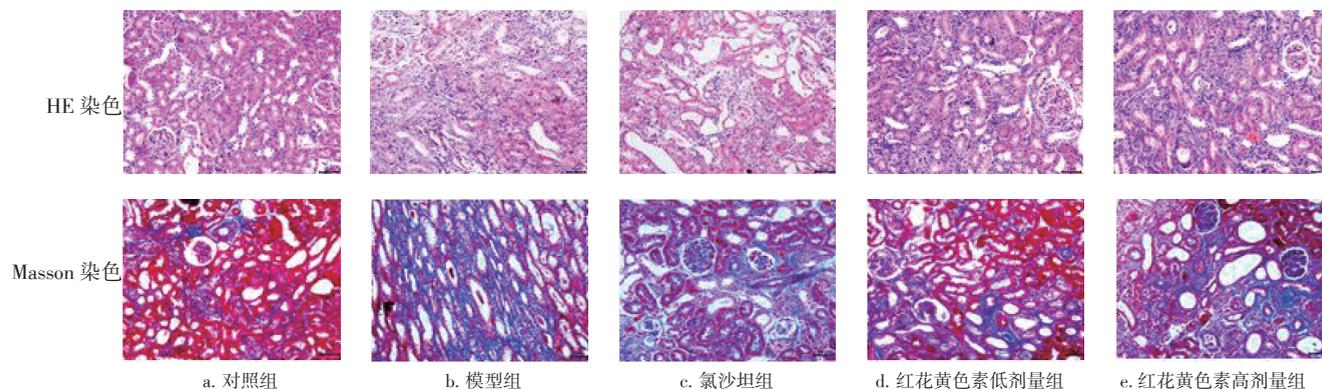


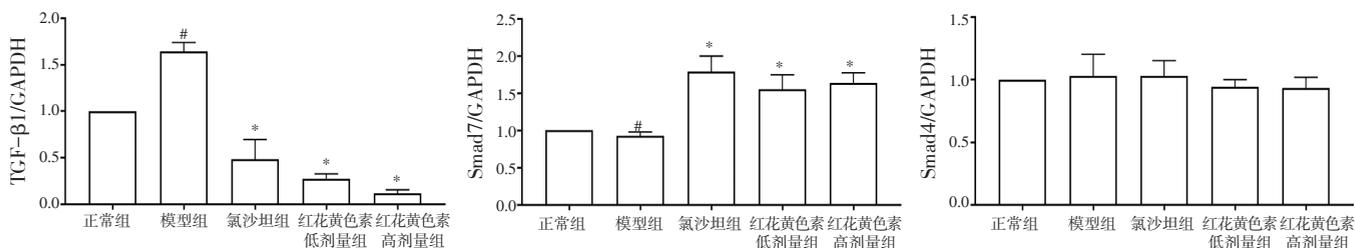
图 1 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织病理学变化的影响(HE、Masson 染色, $\times 200$)

Figure 1 Effects of safflower yellow on pathological changes of kidney in adenine induced renal fibrosis rats (HE and Masson staining, $\times 200$)

2.3 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织中 TGF- β 1、Smad4 及 Smad7 mRNA 表达的影响 结果见图 2。与对照组比较, 模型组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$), Smad7 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$), Smad7 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。各组大鼠肾脏组织中 Smad4

mRNA 表达水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

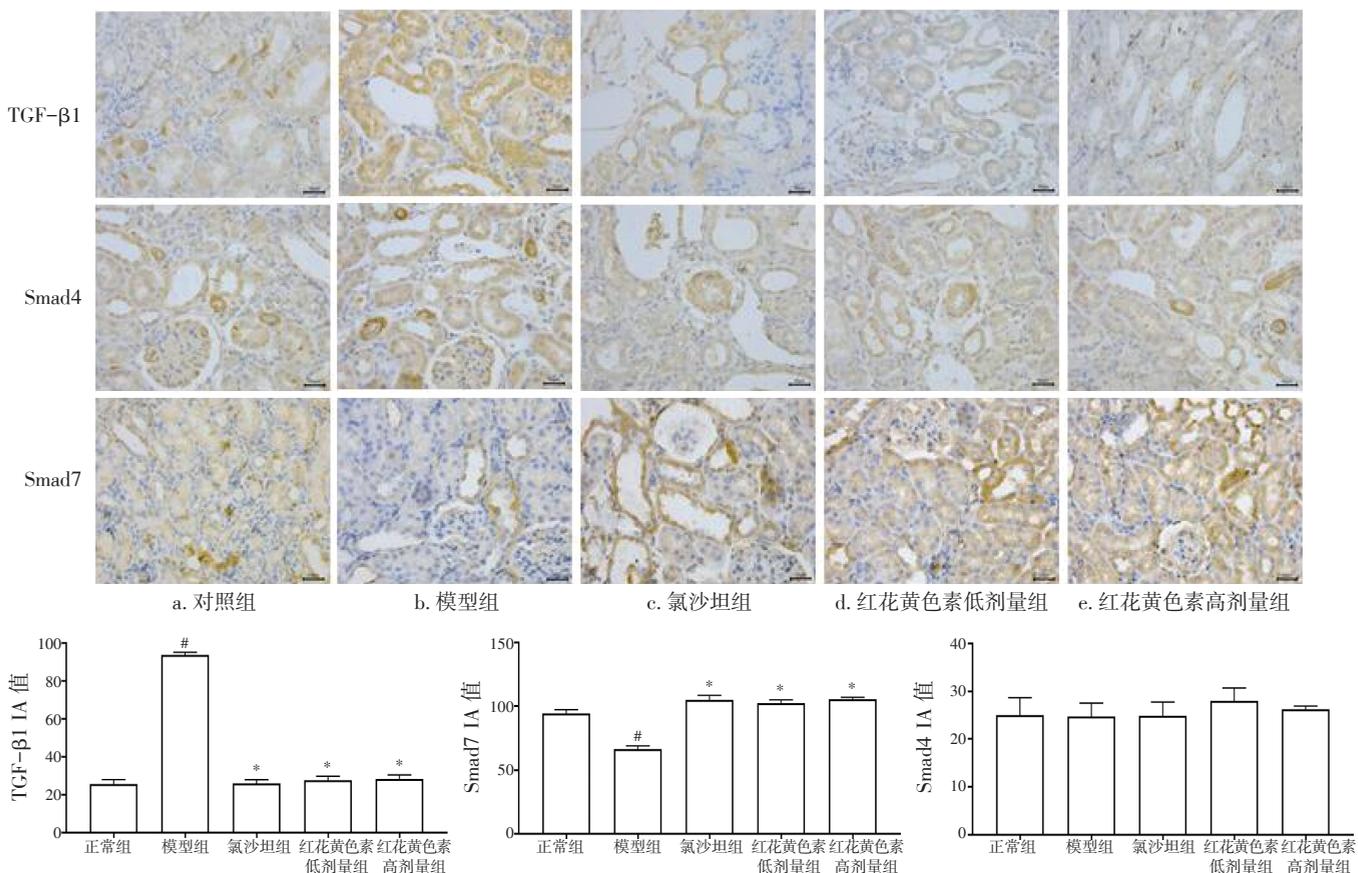
2.4 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织中 TGF- β 1、Smad4 及 Smad7 蛋白表达的影响 结果见图 3、图 4。免疫组化法及 Western Blot 法检测结果均显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), Smad7 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 各用药组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1 蛋白表达水平明显



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$

图2 红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织中TGF-β1、Smad4及Smad7 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 2 Effects of safflower yellow on expression of TGF-β1, Smad4 and Smad7 mRNA of kidney in adenine induced renal fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n=10$)



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$

图3 免疫组化检测红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织中TGF-β1、Smad4及Smad7蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 200$; $\bar{x} \pm s, n=10$)

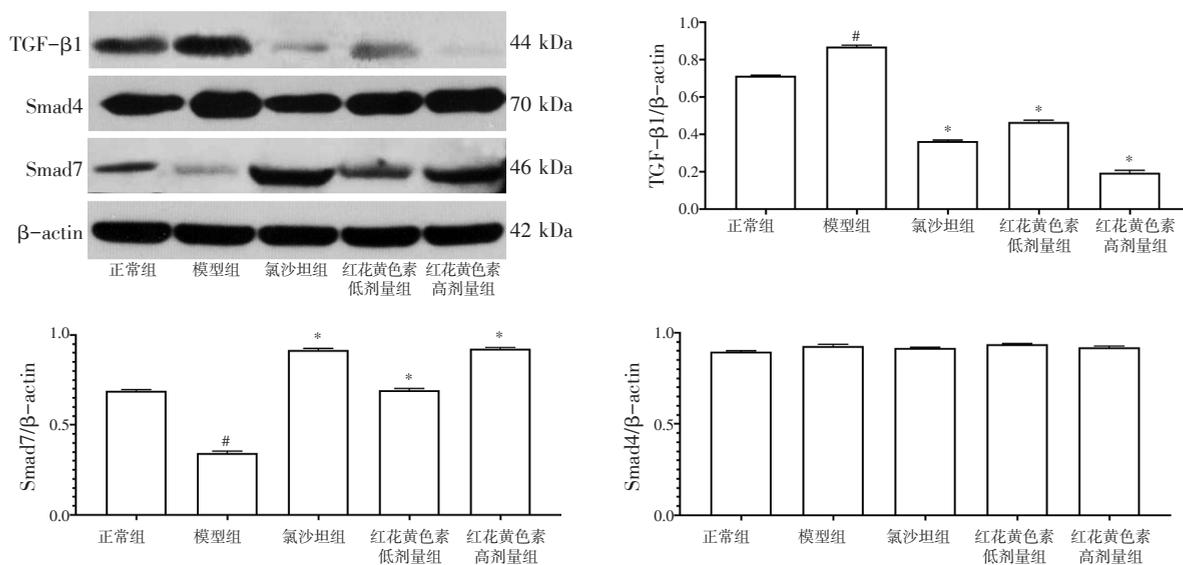
Figure 3 Effects of safflower yellow on proteins expression of TGF-β1, Smad4 and Smad7 of kidney in adenine induced renal fibrosis rats detected by IHC(IHC, $\times 200$; $\bar{x} \pm s, n=10$)

降低($P < 0.05$), Smad7蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。各组大鼠肾脏组织中Smad4蛋白表达水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

肾纤维化是慢性肾病的共同病理表现之一,其主要特征是肌纤维母细胞浸润和细胞外基质的过度沉

积,常会导致肾功能的丧失^[1]。诱导肾纤维化动物模型的方法有药物、手术及转基因等。腺嘌呤是嘌呤类含氮杂环化合物,主要用于化疗药物引起的白细胞减少症的治疗^[1]。在黄嘌呤氧化酶作用下,腺嘌呤可生成2,8-二羟基腺嘌呤而使肾小管堵塞,氮质化合物排出受阻,从而造成血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸等指标升高。血中结晶的过饱和尿酸会



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$

图4 Western Blot法检测红花黄色素对腺嘌呤致肾纤维化大鼠肾脏组织中TGF-β1、Smad4及Smad7蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 4 Effects of safflower yellow on proteins expression of TGF-β1, Smad4 and Smad7 of kidney in adenine induced renal fibrosis rats detected by Western Blot($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

在肾小管、间质及肾小球部位沉积，形成异物导致肾脏局部发生肉芽肿性炎症，大量肾单位损伤，最终引发肾纤维化^[13-14]。故本研究采用腺嘌呤诱导复制大鼠肾纤维化模型，结果发现肾纤维化大鼠血清中Cr、BUN水平明显升高，肾小管扩张或萎缩，纤维化组织增多，间质增宽，表明造模成功。该模型由腺嘌呤化合物沉积于肾小管及间质引起，与临床上肾后性梗阻形成的慢性肾功能衰竭类似，可以用于肾纤维化的研究。

肾纤维化属于中医学“关格”“水肿”等范畴，临床多采用活血化瘀、补益脾肾、通络泄浊等治法。红花黄色素是从活血化瘀类常用中药红花中提取的有效成分。红花是菊科草本植物红花的干燥花，有活血、润燥、止痛、散肿、通经的作用^[9]。研究^[15-16]发现，红花中的主要成分为查尔酮类色素和黄酮醇类化合物，其中以查尔酮类色素化合物的含量最高，而红花黄色素是红花中多种水溶性有效成分的混合物，属查尔酮类有效部位群，具有扩张血管、抗血栓、降血脂、抗炎和改善肾脏微循环的作用。因此，本研究以腺嘌呤诱导肾纤维化大鼠为研究对象，观察了红花黄色素对肾纤维化的影响，并基于TGF-β1/Smad通路探讨相关分子机制，以期为临床治疗提供新思路。

转化生长因子β(TGF-β)是一种多功能细胞因子，参与了细胞生长、分化、凋亡、创面修复与纤

维化等多种细胞过程的调控。TGF-β超家族含有38个成员^[17]，其中TGF-β1是最充足的亚型。在肾脏疾病患者的肾脏组织标本及尿液中，TGF-β1含量明显上升，且与肾脏纤维化程度呈明显正相关，该现象在多种肾脏疾病的动物模型中均被证实。小鼠肾脏过表达TGF-β1可引起肾脏纤维化，而TGF-β1中和抗体、抑制剂、基因敲除等均可使肾纤维化程度减轻^[11]。研究^[17]表明，TGF-β1可以促进细胞外基质(ECM)的生成，即通过促进胶原纤维、纤粘连蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)等合成，同时抑制基质降解酶的活性，减少ECM降解，从而导致肾小球硬化、肾间质纤维化，最终形成慢性肾衰竭。由此可见，TGF-β1是重要的促成纤维化因子之一，而由其参与的TGF-β1/Smad信号通路也与动脉粥样硬化等多种器官硬化、纤维化关系密切。Smad是TGF-β1下游的信号转导分子和重要靶点，分为受体调节型(R-Smads，可直接与活化的I型受体结合而磷酸化)，如Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8；通用型(Co-Smads)，如Smad4；抑制型(I-Smads)，如Smad6、Smad7。Smad6/7对TGF-β1/Smad信号通路起负反馈作用，而Smad4是信号通路必须的转运分子^[1]。TGF-β1可通过促进下游Smad2/3表达，抑制Smad7表达，促进肾纤维化。本研究结果显示，在肾纤维化大鼠肾脏组织中TGF-β1蛋白及mRNA表达水平明显升高，Smad7蛋白及mRNA表达水平明显

降低, 红花黄色素可以明显下调 TGF- β 1 蛋白及 mRNA 表达水平, 上调 Smad7 蛋白及 mRNA 表达水平, 且对 Smad4 蛋白及 mRNA 表达水平无影响。

综上所述, TGF- β 1/Smad 信号通路在肾纤维化大鼠肾脏组织中存在异常激活现象, 而红花黄色素可以通过下调 TGF- β 1 表达及上调 Smad7 表达来抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路的激活, 从而发挥其对肾纤维化大鼠的保护作用。本研究可为红花黄色素在肾纤维化治疗方面的深入开发利用提供实验依据。

参考文献:

- [1] LOVISA S, LEBLEU V S, TAMPE B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis[J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 998-1009.
- [2] GEWIN L S. Renal fibrosis: primacy of the proximal tubule[J]. *Matrix Biology*, 2018, 68: 248-262.
- [3] 刘文静, 南一, 鲁玉梅, 等. 甘草次酸对kk-Ay糖尿病小鼠早中期肾纤维化的保护作用[J]. *云南中医中药杂志*, 2020, 41(3): 72-78.
- [4] MIN C P, SEUNG A C, YOO H J, et al. Ochratoxin a induces epithelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis through TGF- β /Smad2/3 and Wnt1/ β -catenin signaling pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94(9): 3329-3342.
- [5] MIAO J, LIU J, NIU J, et al. Wnt/ β -catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(5): e13004.
- [6] LI R, GUO Y, ZHANG Y, et al. salidroside ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the tlr4/nf- κ b and mapk signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1103-1112.
- [7] BIERNACKA A, DOBACZEWSKI M, FRANGOIANNIS N G. TGF- β signaling in fibrosis[J]. *Growth Factors*, 2011, 29(5): 196-202.
- [8] 杨兰, 陈扬, 何小平. 近五年中医药关于肾纤维化防治的研究回顾[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(20): 2274-2278.
- [9] 史敏, 陈雷, 龚佳佳, 等. 红花黄色素的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(8): 20, 29.
- [10] 叶太生, 张莹雯, 王秀萍, 等. 当归补血汤醇提物和水提物调控 BMP-7、TGF- β 1 表达对腺嘌呤诱导的肾间质纤维化大鼠保护作用的比较[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(11): 2619-2622.
- [11] 孟晓明, 蓝辉耀. 转化生长因子- β 与肾脏纤维化的研究进展[J]. *生理学报*, 2018, 70(6): 612-622.
- [12] 马园园, 刘成海, 陶艳艳. 肾纤维化动物模型特点与研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 398-403.
- [13] 李秀花, 赵丽君, 李娜, 等. 腺嘌呤诱导幼鼠慢性肾功能衰竭模型建立的实验研究[J]. *山西医科大学学报*, 2016, 47(11): 978-981.
- [14] 郭登洲, 王月华, 边东, 等. 红花黄色素对糖尿病肾病大鼠血管紧张素系统的影响[J]. *中成药*, 2009, 31(12): 1832-1836.
- [15] 藏宝霞, 李家实, 吴伟. 硅胶法制备红花总黄色素抗凝血作用的实验研究[J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(2): 106-109.
- [16] 李康康, 张宇, 马鸿杰. 红花黄色素注射液对血透患者急性深静脉血栓形成的预防作用[J]. *中国中医急症*, 2014, 23(12): 2339-2341.
- [17] MENG X M, TANG MK, LI J, et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis[J]. *Frontiers in Physiol*, 2015, 6(19): 1-8.
- [18] 周栋, 傅海燕. 细胞外基质的产生、重塑与肾脏纤维化[J]. *江苏医药*, 2015, 41(8): 936-938.

(编辑: 邹元平)