

复方丹参片通过调控 TGF- β 1/Smad 通路及基质金属蛋白酶水平对肾纤维化大鼠的作用机制研究

张明昊¹, 高一盈¹, 赵盈盈², 赵丹萍², 徐一凡², 于凌爽³, 姚文佳², 刘丹丹¹, 王灿²(1. 河南中医药大学医学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 3. 河南中医药大学康复医学院, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 基于 TGF- β 1/Smad 通路和基质金属蛋白酶水平探讨复方丹参片对肾纤维化大鼠的保护作用及相关机制。**方法** 采用灌胃腺嘌呤(250 mg·kg⁻¹)的方式制备肾纤维化大鼠模型。将大鼠随机分为正常组、模型组、氯沙坦组(0.09 g·kg⁻¹)及复方丹参低(0.3 g·kg⁻¹)、高(0.6 g·kg⁻¹)剂量组。各组大鼠给予相应剂量灌胃给药, 每日 1 次, 连续干预 4 周。检测大鼠血清 Cr、BUN 水平; 采用 HE 及 Masson 染色法观察肾脏组织病理形态及纤维化程度; 采用免疫组织化学法检测肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、Smad7 蛋白表达水平; 采用 Western Blot 法检测肾脏组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠血清 Cr、BUN 水平明显升高($P < 0.05$); 肾脏出现明显纤维化病变; 肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、TIMP-1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), Smad7、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 低、高剂量复方丹参片均能明显降低大鼠血清 Cr、BUN 水平($P < 0.05$); 明显改善肾脏纤维化病变; 降低肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、TIMP-1 蛋白表达水平($P < 0.05$), 升高 Smad7、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平($P < 0.05$)。**结论** 复方丹参片可能通过抑制 TGF- β 1/Smad 通路及提高基质金属蛋白酶水平来实现对肾纤维化大鼠的保护作用。

关键词: 复方丹参片; 肾纤维化; TGF- β 1/Smad 通路; 基质金属蛋白酶; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)03-0300-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.03.004

Pharmacodynamics and Mechanistic Study of Compound *Danshen* Tablet on Renal Fibrosis Rats by Regulating TGF- β 1/Smad Pathway and Level of Matrix Metalloproteinase

ZHANG Minghao¹, GAO Yiyi¹, ZHAO Yingying², ZHAO Danping², XU Yifan², YU Lingshuang³, YAO Wenjia², LIU Dandan¹, WANG Can²(1. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China; 2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China; 3. School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and related mechanisms of compound *Danshen* Tablets on renal fibrosis rats based on TGF- β 1/Smad pathway and matrix metalloproteinase levels. **Methods** The rat model of renal fibrosis was prepared by gavage of adenine(250 mg·kg⁻¹). The rats were randomly divided into normal group, model group, losartan group(0.09 g·kg⁻¹) and compound *Danshen* low-dose(0.3 g·kg⁻¹) and high-dose(0.6 g·kg⁻¹) groups. Rats in each group were given corresponding dose of intragastric administration every day for 4 continuous weeks. The levels of serum Cr and BUN were detected; HE and Masson staining were used to observe the pathological morphology and fibrosis degree of kidney; Immunohistochemistry was used to detect the protein

收稿日期: 2021-05-17

作者简介: 张明昊, 男, 高级实验师, 研究方向: 中药药理学。Email: zhangminghao@hactcm.edu.cn。通信作者: 王灿, 女, 副教授, 研究方向: 中药药理学。Email: wangjiucan@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372270); 河南中医药大学科研苗圃工程项目(MP2020-01)。

expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and Smad7 in renal tissues. Western Blot was used to detect the protein expression levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in kidney tissues. **Results** Compared with normal group, the levels of serum Cr and BUN in model group were significantly increased ($P < 0.05$); The kidney showed obvious fibrosis; The protein expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and TIMP-1 were significantly increased ($P < 0.05$), while the protein expression levels of Smad7, MMP-2 and MMP-9 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, low- and high-dose of compound *Danshen* Tablets could significantly reduce the levels of serum Cr and BUN in rats ($P < 0.05$); the renal fibrosis was significantly improved; the protein expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and TIMP-1 in renal tissue decreased ($P < 0.05$), and the protein expression levels of Smad7, MMP-2 and MMP-9 in renal tissue increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound *Danshen* Tablets may achieve protective effects in rats with renal fibrosis by inhibiting the TGF- β 1/Smad pathway and increasing matrix metalloproteinase levels.

Keywords: Compound *Danshen* Tablets; renal fibrosis; TGF- β 1/Smad pathway; matrix metalloproteinase; rats

肾纤维化(Renal fibrosis, RF)是多种慢性肾脏疾病(Chronic kidney disease, CKD)发展至终末期肾衰竭(End-stage renal disease, ESRD)的共同途径^[1],以肾小管萎缩、肾小球硬化为主要病理特征,并涉及炎性细胞浸润、致纤维化因子激活或释放、细胞因子调节、上皮细胞转化为成纤维细胞、细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度积累等多个病理环节,其中以细胞外基质合成降解失衡致过度沉积为最终改变^[2-3]。细胞外基质主要由胶原、明胶、黏连性蛋白和蛋白多糖组成,其降解过程由基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)和基质金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)参与,这些酶系水平可以影响肾纤维化进程^[4]。转化生长因子 β 1(Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是目前发现的一种促纤维化的信号转导分子,多项肾病研究^[5-6]表明,其表达水平与肾纤维化呈正相关,抑制或敲除 TGF- β 1 的表达可以延缓肾纤维化进程。Smad 是 TGF- β 1 信号通路的下游信号分子和重要靶点,共同参与调控肾纤维化进程^[7]。

复方丹参片是以丹参为君药,辅以三七、冰片制成的一种复方制剂,具有活血化瘀、理气止痛之功效,临床上主要用于防治心脑血管疾病。研究^[8-9]表明,复方丹参制剂能扩张外周血管,增加肾脏血流量,并抑制血小板聚集,促进纤溶,从而改善肾脏纤维化状态。故本研究拟从活血化瘀的中药药理作用出发,采用复方丹参片对肾纤维化大鼠进行干预,以氯沙坦为阳性对照药物,观察其对肾纤维化大鼠肾脏功能、组织病理变化及纤维化的影响,并基于对 TGF- β 1/Smad 通路和基质金属蛋白酶水平的

调控来探讨其抗肾纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠,8 周龄,SPF 级,体质量 180~200 g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号:SCXK(豫)2019-0002,动物使用许可证号:SYXK(豫)2020-0004。本研究经河南中医药大学动物伦理委员会批准,批准号:DWLL20180018。

1.2 药物及试剂 复方丹参片(每片 0.6 g),批号:G20A045,广州白云山和记黄埔中药有限公司;氯沙坦钾片(每片 50 mg),批号:429001,浙江华海药业股份有限公司。腺嘌呤,批号:S18009,重庆科瑞制药有限公司;氨基甲酸乙酯,批号:20200326,天津百伦斯生物技术有限公司;肌酐(Cr)测定试剂盒(批号:C011-1-1)、尿素氮(BUN)测定试剂盒(批号:C013-1-1),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-9018),北京中杉金桥生物技术有限公司;RIPA 裂解液(批号:G2002)、磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:G2007)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号:G2026)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号:G2003)、ECL 试剂盒(批号:G2014)、显影定影试剂(批号:G2019)、兔抗大鼠 β -actin 一抗(货号:GB12001)、HRP 标记山羊抗兔二抗(货号:GB23303),武汉塞维尔生物科技有限公司;兔抗大鼠 TGF- β 1(货号:bs-0086R)、Smad2(货号:bs-0718R)、Smad3(货号:bs-3484R)、Smad7(货号:bs-0566R)、MMP-2(货号:bs-20705R)、MMP-9(货

号: bs-4593R)、TIMP-1(货号: bs-0415R)一抗,北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 仪器 BS110S 型电子天平,北京赛多利斯天平公司;MR-96TB 型酶标仪,骋克仪器(上海)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;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;CX23 型光学显微镜,日本奥林巴斯公司;DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪、DYCZ-40D 型转印电泳仪,北京六一仪器厂;V300 型扫描仪,爱普生(中国)有限公司。

1.4 分组、模型复制及给药 取雄性 SD 大鼠 43 只,适应性饲养 1 周后,按 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃腺嘌呤混悬液,每日 1 次,连续 12 d。然后改为隔日 1 次,连续 12 d。第 25 天随机选取 3 只大鼠,腹腔注射氨基甲酸乙酯麻醉,腹主动脉取血检测 Cr、BUN 水平,并解剖取肾脏做常规病理检查。若大鼠血清 Cr、BUN 水平明显升高,且光镜下肾脏组织纤维化及炎性细胞浸润明显,则提示肾纤维化模型构建成功。

将 40 只肾纤维化模型大鼠按体质量随机分为模型组、氯沙坦组($0.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及复方丹参低、高剂量组(0.3 、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 10 只,另取 10 只 SD 大鼠作为正常组。复方丹参片成人用量为每日 3.6 g,根据人鼠剂量换算公式: $S_{\text{大鼠}(200 \text{ g})} = 0.018 \times S_{\text{人}(70 \text{ kg})}$,得复方丹参片大鼠等效剂量为 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因在前期预实验中发现复方丹参片 $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量对肾纤维化干预作用不明显,故本实验以折算剂量 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为低剂量,以 $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为高剂量。各给药组大鼠按上述剂量灌胃给药,灌胃体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每日 1 次,连续 4 周。

1.5 样本采集 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 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 10 cm)离心 10 min,取上清液,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。然后解剖大鼠取肾脏,去除周围结缔组织,以生理盐水洗涤后将肾脏组织一分为二,其中 1 份用 4% 多聚甲醛固定,另 1 份用液氮速冻后于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.6 血清 Cr、BUN 水平检测 按照试剂盒说明书步骤操作,检测各组大鼠血清 Cr、BUN 水平,并计算 Cr/BUN 比值。

1.7 肾脏组织病理学检测 各组大鼠肾脏组织用 4%

多聚甲醛固定后,经脱水、透明、包埋、切片等步骤,制备 $4 \mu\text{m}$ 病理切片;然后,采用苏木素-伊红(HE)和马松(Masson)染色,于光学显微镜下观察肾脏组织病理学变化及其纤维化情况。

1.8 免疫组织化学法检测肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 及 Smad7 蛋白表达水平 石蜡切片经脱蜡、水化后, H_2O_2 封闭, PBS 清洗,柠檬酸盐缓冲液热修复;滴加山羊血清封闭液,室温下孵育;倾去液体,分别滴加 TGF- β 1、Smad2、Smad3 和 Smad7 抗体(1:100), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;二抗 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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,再次以自来水冲洗;脱水、透明、封片、镜检。在光学显微镜下($\times 400$)随机选取每只大鼠肾脏切片 1 个视野,以棕黄色为阳性染色,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定每个视野中的积分光密度(Integrated Optical Density, IOD)值。

1.9 Western Blot 法检测肾脏组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 蛋白表达水平 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,在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 10 cm)离心 15 min,采用 BCA 蛋白定量法测定上清液蛋白浓度。加上样缓冲液和 RIPA 制备样品,上样量为 $100 \mu\text{g}$ 蛋白;经 SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜,以 5% 脱脂奶粉封闭 2 h;加入一抗 [MMP-2 (1:1000)、MMP-9 (1:1000)、TIMP-1 (1:1000) 及 β -actin (1:3000) 兔抗单克隆抗体],孵育过夜、洗涤;加入二抗 [辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:10000)],室温下孵育 1 h, ECL 显影并扫描。采用 ImageJ 软件测定蛋白条带灰度值,通过计算目的条带与内参 (β -actin) 的灰度值比值来分析 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 蛋白相对表达水平。

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;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

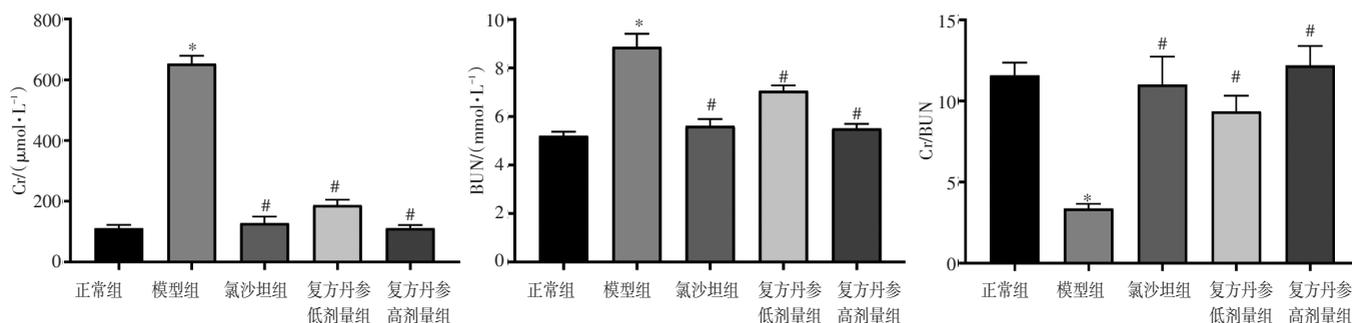
2 结果

2.1 复方丹参片对肾纤维化大鼠血清 Cr、BUN 水平的影响 结果见图 1。与正常组比较,模型组大鼠血清 Cr、BUN 水平明显升高($P < 0.05$), Cr/BUN 值明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,氯沙坦组和复方

丹参低、高剂量组大鼠血清 Cr、BUN 水平明显降低 ($P < 0.05$), Cr/BUN 值明显升高 ($P < 0.05$)。

2.2 复方丹参片对肾纤维化大鼠肾脏组织病理变化的影响 结果见图 2。HE 染色结果显示, 正常组大鼠肾小球形态规则, 肾小管结构排列整齐, 无系膜增生, 间质正常, 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, 球囊粘连, 间质增宽, 可见炎性细胞浸

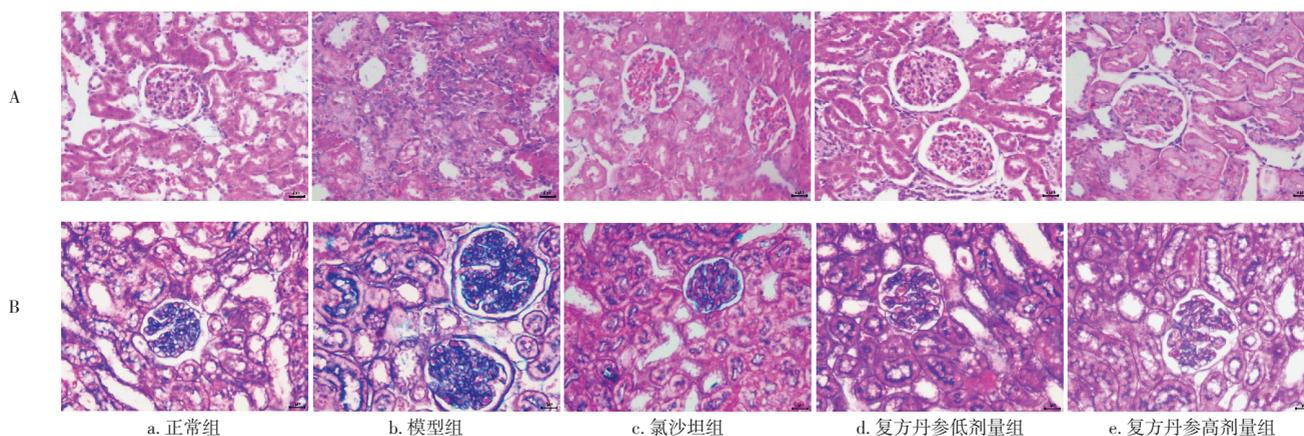
润; 氯沙坦组和复方丹参低、高剂量组大鼠肾小管扩张或萎缩减轻, 炎性细胞减少, 病变明显减轻。Masson 染色结果显示, 正常组大鼠肾脏组织仅有少量胶原蛋白沉积, 胶原染色呈蓝色; 模型组大鼠肾脏组织有大面积胶原蛋白沉积; 氯沙坦组和复方丹参低、高剂量组大鼠肾脏组织中的胶原蛋白沉积得到不同程度的改善。



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

图 1 复方丹参片对肾纤维化大鼠血清 Cr、BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 1 The effect of compound *Danshen* Tablets on the level of Cr and BUN in renal fibrosis rats serum ($\bar{x} \pm s, n=10$)



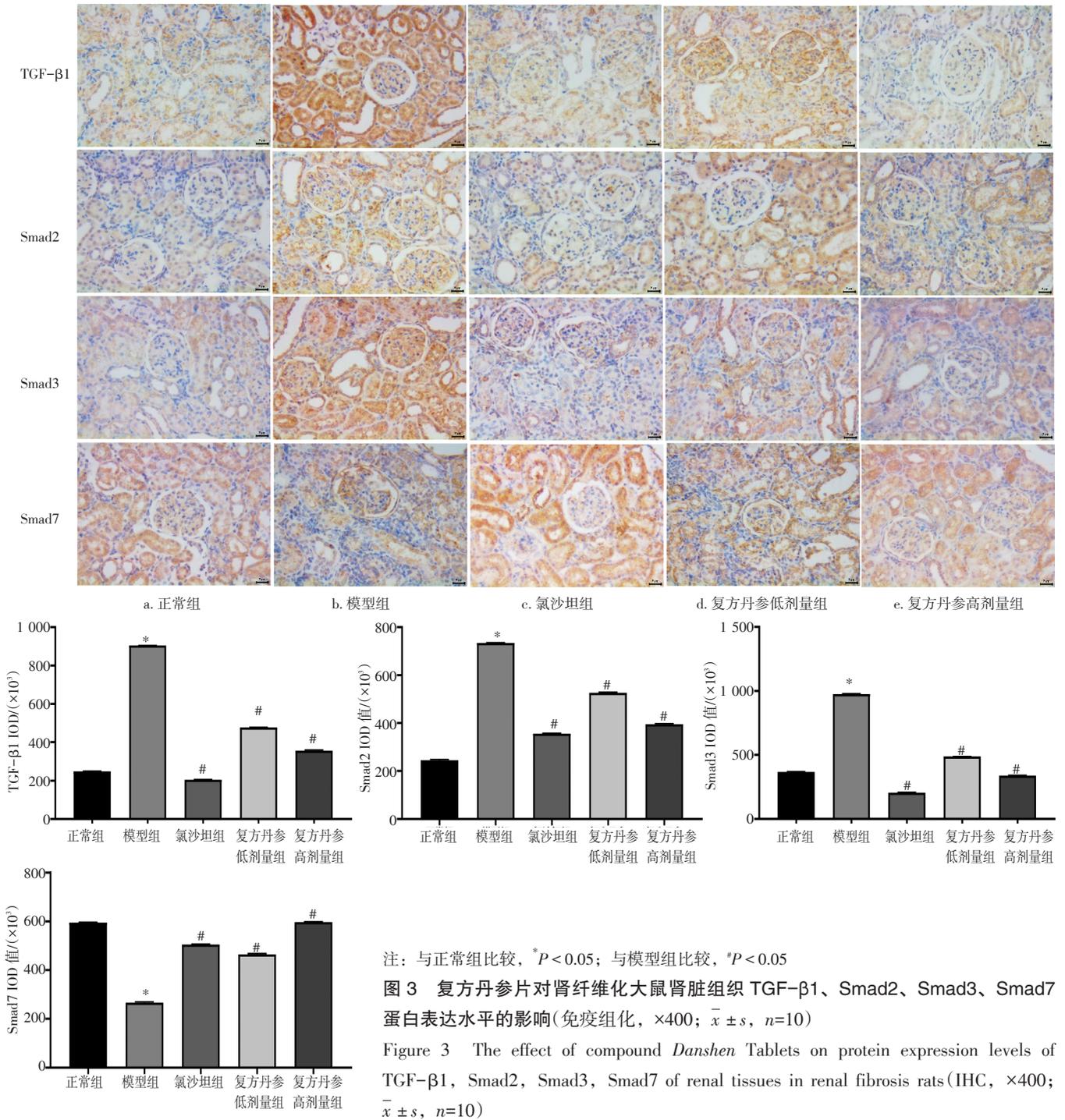
注: A. HE 染色; B. Masson 染色

图 2 复方丹参片对肾纤维化大鼠肾脏组织病理变化的影响 ($\times 400$)

Figure 2 The effect of compound *Danshen* Tablets on renal tissue histopathology in renal fibrosis rats ($\times 400$)

2.3 复方丹参片对肾纤维化大鼠肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、Smad7 蛋白表达水平的影响 结果见图 3。与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 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, 氯沙坦组和复方丹参低、高剂量组大鼠肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), Smad7 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。

2.4 复方丹参片对肾纤维化大鼠肾脏组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 蛋白表达水平的影响 结果见图 4。与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), TIMP-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 氯沙坦组和复方丹参低、高剂量组大鼠肾脏组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 氯沙坦组和复方丹参高剂量组肾脏组织 TIMP-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。



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

图3 复方丹参片对肾纤维化大鼠肾脏组织 TGF-β1、Smad2、Smad3、Smad7 蛋白表达水平的影响(免疫组化, ×400; $\bar{x} \pm s, n=10$)

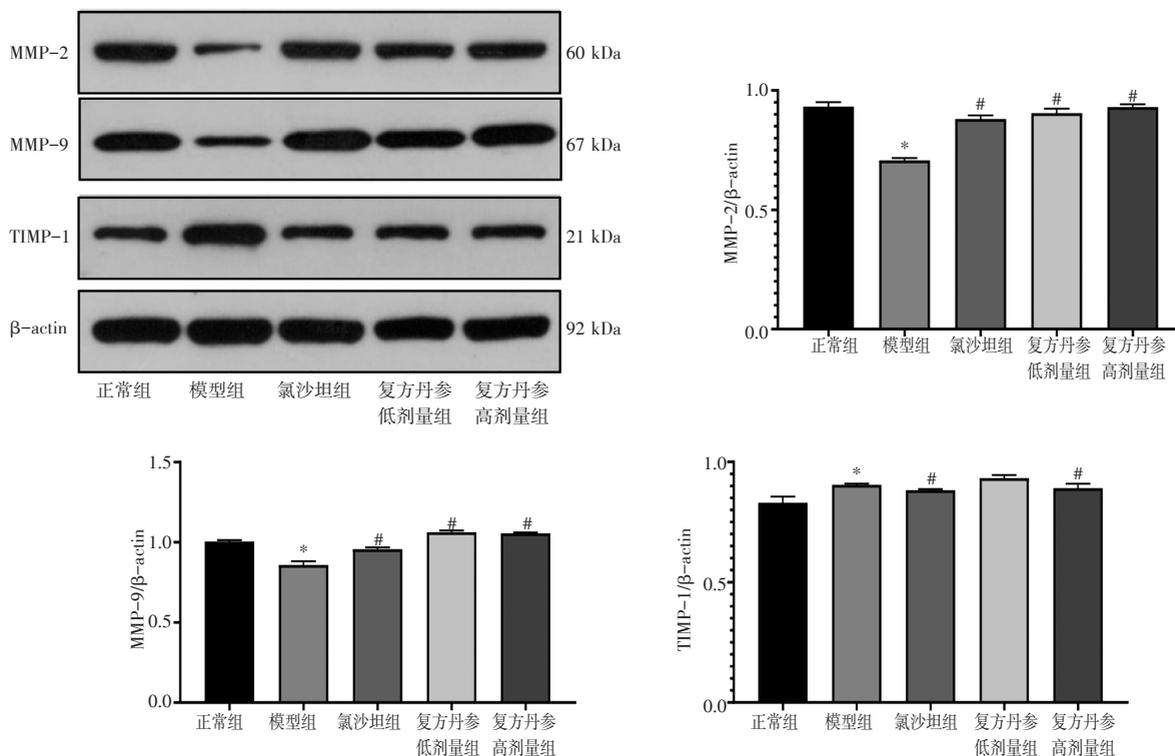
Figure 3 The effect of compound *Danshen* Tablets on protein expression levels of TGF-β1, Smad2, Smad3, Smad7 of renal tissues in renal fibrosis rats(IHC, ×400; $\bar{x} \pm s, n=10$)

3 讨论

肾纤维化是多种慢性肾脏疾病发展至终末期的最终表现，其动物模型可通过药物、手术及转基因等方法诱导构建，其中由腺嘌呤诱导的肾纤维化模型具有方法简单、成模快的优势^[10]，故在肾纤维化研究领域应用较多。腺嘌呤是嘌呤类含氮杂环化合物，在黄嘌呤氧化酶作用下可生成 2,8-二羟基腺嘌呤，该化合物可堵塞肾小管，阻止氮质化合物排出，使血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸等指标升高。大量过饱和尿酸会在血液中结晶并沉积于肾小管、

间质及肾小球部位，而这些沉积异物会使肾脏局部发生肉芽肿性炎症，引起大量肾单位损伤，最终导致肾纤维化^[11-12]。本研究采用腺嘌呤诱导构建了大鼠肾纤维化模型，结果发现肾纤维化大鼠血清 Cr、BUN 水平明显升高，Cr/BUN 值明显降低，肾小管出现不同程度扩张或萎缩，间质增宽且纤维化组织增多，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，与临床上由肾后性梗阻引起的慢性肾衰竭相似，可用于肾纤维化的实验研究。

根据肾纤维化的临床特点可将其归属于中医学



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

图4 复方丹参片对肾纤维化大鼠肾脏组织MMP-2、MMP-9、TIMP-1蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 4 The effect of compound *Danshen* Tablets on protein expression levels of MMP-2、MMP-9、TIMP-1 of renal tissues in renal fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

“水肿”“肾劳”“癃闭”等范畴，由脾肾亏虚、正气不足，湿浊、瘀血阻滞于肾络而引发，故“肾络闭阻”为其主要病机^[13-15]。丹参具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、养血安神之功效，其水溶性成分丹参素、丹酚酸B均能降低肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)水平，缓解细胞外基质聚集；脂溶性成分丹参酮II A能拮抗高糖诱导的EMT信号，减少损伤早期肾脏纤维细胞聚集，从而改善肾纤维化水平^[16-17]。三七具有去瘀生新、消肿定痛之功效，近年药理学研究^[18]发现，三七及其主要活性成分三七总皂苷能通过抑制TGF-β1表达来延缓肾间质纤维化进程，并可纠正肾纤维化大鼠的脂质代谢紊乱，改善贫血，减轻肾损伤。复方丹参片是由丹参、三七、冰片组成的中药复方制剂，具有活血化瘀、理气止痛的功效，临床上常用于心脑血管疾病的治疗^[19-20]。基于“祛瘀通络”的治疗理念，本研究选择复方丹参片为治疗药物，观察其对肾纤维化大鼠的影响。结果发现复方丹参片能显著降低肾纤维化大鼠血清Cr、BUN水平，改善肾脏组织纤维化病变程度，表明其对肾纤维化大鼠具有较好的保护作用。

TGF-β是一种多功能细胞调控因子，与细胞增

殖、分化、凋亡及胞外蛋白质合成等过程密切相关。TGF-β1是TGF-β超家族中的主要亚型之一，在肾病患者的肾脏组织标本及尿液中，其表达水平明显升高。TGF-β1参与的TGF-β1/Smad通路在肾病患者肾脏组织标本中也存在异常激活，这一现象与肾纤维化程度呈正相关，并在多种肾脏疾病动物模型中被证实。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、基因敲除等手段均可使肾纤维化程度减轻^[21]。进一步研究^[22]发现，TGF-β1可以通过促进胶原纤维、纤黏连蛋白(FN)、层黏连蛋白(LN)合成，抑制MMPs活性来促进细胞外基质生成及减少降解，从而导致肾小球硬化及肾间质纤维化，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，而由其参与的TGF-β1/Smad信号通路也与多种器官硬化、纤维化关系密切。Smad是TGF-β1/Smad通路的下游信号分子和重要靶点，有受体调节型(R-Smads)、通用型(Co-Smads)、抑制型(I-Smads)等多个亚型。在TGF-β1/Smad通路调控方面，Smad2、Smad3起正调控作用，Smad6、Smad7则起负调控作用^[23-24]。肾纤维化形成的重要环节是细胞外基质的过度沉积，而MMPs则是降解细胞外基质的特异酶系，以MMP-2、

MMP-9 为代表, 其对应的抑制因子是 TIMP-1。细胞外基质能否保持动态平衡, 其关键就在于 MMPs 与 TIMP-1 能否维持相对平衡, 故可以 MMPs/TIMP-1 比值来衡量细胞外基质动态平衡的维持状态, 该比值增加则可刺激细胞外基质降解, 反之则会使细胞外基质过度沉积。进一步研究^[25-27]表明, TGF- β 1/Smad 通路可以诱导胶原 I 和纤连蛋白以促进细胞外基质合成, 还可以使 MMPs 和 TIMPs 失衡以抑制细胞外基质降解, 同时诱导胶原分泌及促进肌纤维母细胞转分化和增殖, 从而促进纤维化的形成。本研究结果发现, 肾纤维化大鼠肾脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、TIMP-1 蛋白水平明显升高, Smad7、MMP-2、MMP-9 蛋白水平明显降低, 表明 TGF- β 1/Smad 通路被激活, MMPs/TIMP-1 值降低。而复方丹参片可以下调 TGF- β 1、Smad2、Smad3、TIMP-1 蛋白表达水平, 上调 Smad7、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平, 即通过抑制 TGF- β 1/Smad 通路及提高 MMPs/TIMP-1 值以降低细胞外基质沉积水平, 从而发挥其对肾纤维化的保护作用。

综上所述, 复方丹参片能降低肾纤维化大鼠的肾脏纤维化程度, 对肾脏功能具有较好的保护作用, 其机制可能与通过下调 TGF- β 1、Smad2、Smad3 表达及上调 Smad7 表达以抑制 TGF- β 1/Smad 通路, 下调 TIMP-1 表达及上调 MMP-2、MMP-9 表达以降低细胞外基质沉积水平有关。该结果可为复方丹参片在肾纤维化治疗方面的深入开发利用提供新的实验依据。

参考文献:

- [1] 袁金凤, 陈兰英, 王慧玲, 等. 金匱肾气丸对腺嘌呤致肾间质纤维化大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 150-156.
- [2] 梁亮, 崔长乐, 何学红. 参芪泄浊饮对腺嘌呤肾间质纤维化模型大鼠肾脏组织MMP-9、TIMP-1基因表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(1): 190-193.
- [3] 吉晶, 何立群. 抗仙灵方对肾纤维化大鼠TGF- β 1/Smad信号通路表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 69-75.
- [4] 郑洪, 李德祥, 张锚链. TBM介导的肾间质纤维化中细胞外基质和金属蛋白酶的动态变化[J]. 遵义医学院学报, 2002, 25(2): 100-102.
- [5] 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.
- [6] MENG X M, CHUNG A C, LAN H Y. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(4): 243-254.
- [7] 高艳红, 张昱, 李澎. 基于TGF- β 1/Smad信号通路的加味黄芪赤风汤抗肾脏纤维化机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(12): 1486-1490.
- [8] 李晓霞, 李新, 林娟, 等. 复方丹参片及其拆方对心肌缺血大鼠模型的影响[J]. 药物评价研究, 2020, 43(6): 1026-1032.
- [9] 詹晓宇. 复方丹参注射液治疗糖尿病肾病纤维化的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(8): 47-48.
- [10] 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.
- [11] ZHANG R, JIANG J, YU Y, et al. Analysis of structural components of decellularized scaffolds in renal fibrosis[J]. Bioactive Materials, 2021, 6(7): 2187-2197.
- [12] LU B, LUO C H, FENG W F. Effects of losartan on cell apoptosis and expression of caspase-3 and JNK Proteins in kidney tissue in renal interstitial fibrosis rats[J]. Medicinal Plant, 2020, 11(1): 63-66, 70.
- [13] 吉晶, 何立群. 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾功能及肾脏组织ECM表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 63-68.
- [14] 叶太生, 张莹雯, 王秀萍. 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.
- [15] 张明昊, 高一盈, 赵盈盈, 等. 桃核承气汤对肾纤维化大鼠的保护作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(17): 2324-2327, 2334.
- [16] 陈程, 李均. 丹参及其有效成分对肾纤维化的影响作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(12): 1119-1121.
- [17] 高明月, 马进. 抗肾间质纤维化研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(4): 138-141.
- [18] 李娜, 王风云, 高小玲, 等. 中药三七防治肾纤维化的研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(11): 2974-2978.
- [19] 梁小娜, 林娟, 李新, 等. 复方丹参片及其拆方对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的改善作用和机制探讨[J]. 2019, 50(12): 2884-2890.
- [20] LV Y, LIU X, YAN S, et al. Metabolomic study of myocardial ischemia and intervention effects of compound danshen tablets in rats using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Pharmaceut Biomed, 2010, 52(1): 129-135.
- [21] WANG B, KOMERS R, CAREW R, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(2): 252-265.
- [22] DOI S, ZOU Y, TOGAO O, et al. Klotho inhibits transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice[J]. J Biol Chem, 2011, 286(10): 8655-8665.
- [23] MENG X M, HUANG X R, CHUNG A. Smad2 protects against TGF- β /Smad3-mediated renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9): 1477-1487.
- [24] CHUNG A, YUAN D, YANG W, et al. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- β /Smad3-regulated microRNAs [J]. Molecular Therapy, 2013, 21(2): 388-398.
- [25] MANSOUR S G, PUTHUMANA J, COCA S G, et al. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review[J]. BMC Nephrology, 2017, 18(1): 1-13.
- [26] YU X, HU Y, ZHANG Y, et al. Integrating the polydopamine nanosphere/aptamers nanoplatfrom with a DNase-I-assisted recycling amplification strategy for simultaneous detection of MMP-9 and MMP-2 during renal Interstitial Fibrosis[J]. ACS Sensors, 2020, 5(4): 1119-1125.
- [27] 徐敏, 项荣. 喉啞啞对糖尿病肾病大鼠肾纤维化与基质金属蛋白酶表达水平的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(21): 2532-2535.

(编辑: 邹元平)