

· 中药药理与质量 ·

加味六味地黄汤对大鼠肾间质纤维化的干预机制

黄仁发¹, 梁群卿², 李贺生¹, 杨义龙¹, 黄家晟¹, 陈鹏辉¹, 杨朔¹, 吴金玉³

(1. 广州中医药大学深圳医院(福田)肾病科, 广东深圳 518034; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院健康体检中心, 广西南宁 530011; 3. 广西中医药大学第一附属医院肾内科, 广西南宁 530023)

摘要:【目的】探讨加味六味地黄汤对大鼠肾间质纤维化的干预机制。【方法】将120只健康成年SD大鼠随机分为假手术组、模型组、中药组、缬沙坦组等4组, 4组组内再按7、14、28 d 3个时间点分组, 每组10只。除假手术组, 其他组别大鼠均采用结扎输尿管法构建单侧输尿管梗阻模型。假手术组除不结扎输尿管外其他手术步骤均与上述造模方法相同。成功造模后, 中药组术后24 h给予加味六味地黄汤 $2.376\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 缬沙坦组术后24 h给予缬沙坦 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 假手术组和模型组均在术后24 h给予等体积生理盐水灌胃, 每日1次, 直至相应实验时间点处死。采用免疫组织化学法检测肾组织c-myc、纤维连接蛋白(Fn)的表达, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测肾组织Wnt4、 β -连环蛋白(β -catenin)、磷酸化糖原合成酶 3β (p-GSK-3 β)、磷酸化T细胞因子/淋巴增强因子(p-TCF/LEF)的表达。【结果】与假手术组相同时间点比较, 模型组大鼠肾组织Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF、Fn和c-myc蛋白表达水平显著上调, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组相同时间点比较, 中药组和缬沙坦组大鼠肾组织Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF、Fn和c-myc蛋白的表达水平下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且2个治疗组组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】加味六味地黄汤具有抗肾间质纤维化作用, 其机制可能与阻断Wnt4/ β -catenin信号通路的活化, 下调Fn和c-myc蛋白的表达有关。

关键词: 加味六味地黄汤; 肾间质纤维化; 单侧输尿管梗阻; Wnt4/ β -catenin信号通路; 纤维连接蛋白; c-myc; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)10-2197-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbcm.2021.10.026

Intervention Mechanism of Modified *Liuwei Dihuang Tang* for Renal Interstitial Fibrosis in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction

HUANG Ren-Fa¹, LIANG Qun-Qing², LI He-Sheng¹, YANG Yi-Long¹,
HUANG Jia-Sheng¹, CHEN Peng-Hui¹, YANG Shuo¹, WU Jin-Yu³

(1. Dept. of Nephrology, Shenzhen Hospital (Futian) of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 518034 Guangdong, China; 2. Health Care Center, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011 Guangxi, China; 3. Dept. of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023 Guangxi, China)

Abstract: Objective To explore the intervention mechanism of modified *Liuwei Dihuang Tang* for renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). **Methods** One hundred and twenty healthy adult SD rats were randomly divided into 4 groups, namely sham operation group, model group, Chinese medicine group and valsartan group, the above each group was further divided into 3 sub-groups according to 3 time points including 7, 14, 28 days, 10 rats in each group. Apart from the sham operation group, the rats of the other groups were induced into UUO model by ligation of ureter. The sham operation group was given the same other operation except for ligation of ureter. After successful modeling, the rats in Chinese medicine group were given intragastric

收稿日期: 2020-09-09

作者简介: 黄仁发(1972-), 男, 博士, 教授; E-mail: huangrenfa1972@163.com

通讯作者: 吴金玉, 女, 医学博士, 教授; E-mail: wujinyu0109@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81760805, 81460682); 广东省自然科学基金资助课题(编号: 2020A151501572); 深圳市科创委课题(编号: JCYJ201908091024131560)

administration of modified *Liuwei Dihuang Tang* of $2.376 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ hour 24 after operation, the valsartan group was given intragastric administration of valsartan of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ hour 24 after operation, and the sham operation group and model group were given intragastric administration of the same volume of normal saline hour 24 after operation, once a day, reaching at corresponding detection time points for killing. The protein expression levels of c-myc and fibronectin (Fn) in rat kidney tissue were detected by immunohistochemistry, and the protein expression levels of Wnt4, β -catenin, phosphorylated glycogen synthase kinase 3β (p-GSK- 3β), phosphorylated T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (p-TCF/LEF) in rat kidney tissue were detected by Western blotting assay. **Results** Compared with the sham operation group at the corresponding time points, the protein expression levels of Wnt4, β -catenin, p-GSK- 3β , p-LEF/TCF, Fn and c-myc in rat kidney tissue were up-regulated in the model group, the difference being significant ($P < 0.01$). Compared with the model group at the corresponding time points, the protein expression levels of Wnt4, β -catenin, p-GSK- 3β , p-LEF/TCF, Fn and c-myc in rat kidney tissue were down-regulated in the Chinese medicine group and valsartan group, the difference being significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there were no differences between the two treatment groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Modified *Liuwei Dihuang Tang* has anti-renal interstitial fibrosis role, whose mechanism is related with blocking the activation of Wnt4/ β -catenin signaling pathway and down-regulating the protein expression of Fn and c-myc.

Keywords: modified *Liuwei Dihuang Tang*; renal interstitial fibrosis; unilateral ureteral obstruction; Wnt4/ β -catenin signaling pathway; fibronectin(Fn); c-myc; rats

我们的前期临床研究表明, 加味六味地黄汤(又名怡肾汤)能减少慢性肾衰竭患者蛋白尿, 改善肾功能, 调节免疫功能^[1]; 肾纤维化是慢性肾脏病进展到终末期肾衰竭的共同路径, 动物实验研究表明, 该方能改善单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction)大鼠肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis), 保护肾功能, 其机制可能与阻断 Wnt4/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路的活化, 下调纤维生长因子 23 (FGF-23)的表达有关^[2]。Wnt/ β -catenin 是进化上高度保守的信号通路, 其生物学作用广泛, 参与细胞增生、分化、凋亡、三维组织器官的形成、生长发育等过程^[3]。经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路主要由细胞外因子 Wnt 蛋白、 β -catenin、糖原合成激酶 3β (GSK- 3β)、结肠腺瘤性息肉蛋白(APC)、核内转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)等信号分子组成^[4]。其中, Wnt4 蛋白主要表达于泌尿生殖系统, 对泌尿生殖系统发育至关重要^[5]。近年来的研究表明, 纤维连接蛋白(Fn)、原癌基因 c-myc 不仅参与了细胞外基质的积聚形成, 而且还是 Wnt4/ β -catenin 信号通路靶基因, Wnt4/ β -catenin 信号通路活化后可通过调控 Fn 和 c-myc 表达增多参与肾间质纤维化

过程^[6]。本研究中, 我们进一步观察单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 Wnt4/ β -catenin 信号分子磷酸化 GSK- 3β (p-GSK- 3β)、磷酸化 LEF/TCF (p-LEF/TCF) 以及 Fn 和 c-myc 的表达变化以及加味六味地黄汤的干预作用, 以明确加味六味地黄汤抗肾间质纤维化的作用机制和靶点, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 120 只清洁级健康 10~12 周龄雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠, 体质量(210 ± 34)g, 购自上海斯莱克景达实验动物有限公司, 动物质量合格证号: SCXK(湘)2013-0004。在广西中医药大学实验动物学部按标准条件饲养, 室内温度为 $18 \sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$, 每天保证 12 h 照明, 并每日定时清洗笼舍, 保证实验大鼠能自由摄食、饮水。

1.2 实验药物及制备 加味六味地黄汤由熟地黄 10 g、山茱萸 10 g、干山药 15 g、泽泻 10 g、茯苓 12 g、丹皮 10 g、黄芪 30 g、桂枝 10 g、大黄 10 g、丹参 15 g 组成。以上中药材均购自广西中医药大学附属瑞康医院药剂科。将以上中药材浸泡 2 h 后, 急火煮沸, 再微火煎煮至少 30 min。每剂药煎熬 2 次, 置于容器, 混匀浓缩为含生药 1 g/mL 的药

液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 试剂 小鼠源性 Wnt4 多克隆抗体、小鼠源性 β -catenin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); 小鼠源性 p-GSK-3 β 多克隆抗体(美国 Abcam 公司); 小鼠源性 p-TCF/LEF 多克隆抗体、小鼠源性 Fn 多克隆抗体、小鼠源性 c-myc 多克隆抗体(北京博奥森生物公司); SP 免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 蛋白提取试剂盒(上海申能博彩生物技术公司); 二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒、苯甲基磺酰氟(PMSF)(江苏碧云天生物技术公司); 聚偏氟乙烯(PVDF)膜(苏州广惠科技术有限公司)。

1.4 仪器 生物光学显微镜、RM2125 型石蜡切片机、UCT 型超薄切片机、H1650R 型台式高速冷冻离心机、SPECTRA max Plus 384 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); ChemiDoc XRS+ System 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.5 分组、造模与给药 将 120 只大鼠随机分为假手术组、模型组、中药组、缬沙坦组等 4 组, 每组 30 只, 然后各组组内再分成 7、14、28 d 等 3 个时间点, 每个时间点 10 只大鼠。除假手术组, 其他组别大鼠均构建单侧输尿管梗阻模型。单侧输尿管梗阻大鼠模型是经典的肾间质纤维化模型, 造模方法按照本课题组前期研究^[6]报道的步骤进行。步骤简述如下: 用 100 g/L 的水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠后, 从左肋下钝性分离暴露左肾, 左侧输尿管上段行双线(4号丝线)结扎并在两结扎点间剪断输尿管。假手术组除不结扎输尿管外其他手术步骤均与上述造模方法相同。术后 24 h, 中药组即开始给予加味六味地黄汤 $2.376\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (2 mL/d)灌胃, 缬沙坦组给予缬沙坦 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (2 mL/d)灌胃, 同时, 假手术组和模型组均给予生理盐水 2 mL/d 灌胃, 每日 1 次, 直至相应实验时间点处死。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF 蛋白的表达 取备检的大鼠肾组织剪成碎片, 加入蛋白裂解液提取总蛋白, 用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度。电泳, 转膜, 封闭, Wnt4 多克隆抗体(1:100 稀释)孵育, 二抗孵育。用 IPP 图像分析软件测量蛋白条带的光密度(OD)值, 以 β -actin 蛋

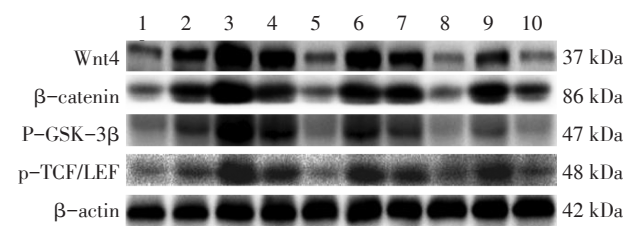
白为内参照, 计算 $\text{OD}_{\text{目的蛋白}}/\text{OD}_{\beta\text{-actin}}$ 比值作为目的蛋白的表达量。 β -catenin 多克隆抗体(1:200 稀释)、p-GSK-3 β 多克隆抗体(1:200 稀释)、p-TCF/LEF 多克隆抗体(1:200 稀释)、 β -actin 多克隆抗体(1:3 000 稀释)的检测步骤同前。

1.6.2 免疫组织化学法检测大鼠肾组织 c-myc、Fn 蛋白的表达 将肾组织切片常规脱蜡至水, 用体积分数 3% H_2O_2 阻断灭活内源性过氧化物酶, 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液煮沸修复抗原, 羊血清工作液封闭, 滴加 c-myc 多克隆抗体(1:150 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 滴加二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 二氨基联苯胺(DAB)显色 5~20 min。显微镜(200~400 倍)下观察大鼠肾组织蛋白表达的量及部位, 肾小管上皮细胞胞浆有棕黄色颗粒为阳性, 不着色者为阴性, 测量阳性表达蛋白的 OD 值。Fn 多克隆抗体(1:150 稀释)的检测步骤同前。

1.7 统计方法 采用 SPSS 20.0 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。若方差齐性, 多组比较采用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 法进行多重比较; 如方差不齐, 则用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF 表达比较 图 1 和表 1 结果显示: 假手术组大鼠肾组织可见少量 Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-LEF/TCF 蛋白表达, 模型组大鼠第 7 天肾组织即可见明显的 Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-LEF/TCF 表达, 至 14 d 达高峰。与假手术组相同时间点比较, 模型组大鼠肾组织



1. 假手术组 14 d; 2~4 分别表示模型组 7、14、28 d; 5~7 分别表示中药组 7、14、28 d; 8~10 分别表示缬沙坦组 7、14、28 d

图 1 各组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF 电泳条带

Figure 1 The electrophoresis strips of Wnt4, β -catenin, p-GSK-3 β , p-TCF/LEF in kidney tissue of various groups

表1 各组大鼠肾组织Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF蛋白相对表达量比较
Table 1 Comparison of the relative protein expression levels of Wnt4, β -catenin, p-GSK-3 β , p-TCF/LEF in kidney tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点(d)	鼠数(只)	Wnt4蛋白相对表达量	β -catenin蛋白相对表达量	p-GSK-3 β 蛋白相对表达量	p-TCF/LEF蛋白相对表达量
假手术组	14	10	0.25 \pm 0.11	0.22 \pm 0.09	0.07 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02
模型组	7	10	0.52 \pm 0.12 ^①	0.52 \pm 0.12 ^①	0.18 \pm 0.06 ^①	0.18 \pm 0.12 ^①
	14	10	1.36 \pm 0.38 ^①	1.18 \pm 0.41 ^①	1.14 \pm 0.36 ^①	0.72 \pm 0.22 ^①
	28	10	1.07 \pm 0.24 ^①	0.65 \pm 0.14 ^①	0.31 \pm 0.02 ^①	0.32 \pm 0.13 ^①
中药组	7	10	0.26 \pm 0.10 ^③	0.24 \pm 0.08 ^③	0.08 \pm 0.02 ^③	0.08 \pm 0.04 ^③
	14	10	1.03 \pm 0.22 ^②	0.85 \pm 0.18 ^③	0.32 \pm 0.11 ^③	0.43 \pm 0.12 ^③
	28	10	0.78 \pm 0.12 ^②	0.67 \pm 0.35	0.15 \pm 0.08 ^③	0.18 \pm 0.09 ^②
缬沙坦组	7	10	0.21 \pm 0.09 ^③	0.18 \pm 0.10	0.07 \pm 0.01 ^③	0.09 \pm 0.05 ^③
	14	10	0.94 \pm 0.25 ^②	0.83 \pm 0.31 ^③	0.25 \pm 0.12 ^③	0.41 \pm 0.13 ^③
	28	10	0.69 \pm 0.16 ^③	0.16 \pm 0.05 ^③	0.09 \pm 0.03 ^③	0.22 \pm 0.11 ^②

① $P < 0.01$, 与假手术组相同时间点比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与模型组相同时间点比较

Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-LEF/TCF 表达量明显上调, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组相同时间点比较, 中药组和缬沙坦组大鼠肾组织Wnt4、 β -catenin、p-GSK-3 β 、p-TCF/LEF蛋白表达量明显下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且中药组与缬沙坦组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠肾组织c-myc、Fn蛋白表达比较 图2、图3和表2结果显示: 假手术组大鼠肾组织可见少

量c-myc、Fn蛋白分布; 模型组大鼠第7天肾小管间质胞浆即可见明显的c-myc、Fn蛋白分布, 表达水平高于假手术组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 至14 d达高峰; 中药组和缬沙坦组肾小管间质c-myc、Fn蛋白分布面积减少, 表达水平低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

Wnt/ β -catenin 是一重要的高度保守细胞信号通路, 其生理作用广泛, 涉及细胞的增生、分化、细胞命运的决定、组织器官的生长发育等。Wnt和 β -catenin是该信号通路的核心分子, 无Wnt信号刺激时, β -catenin可与轴蛋白(axin)/APC/GSK-3 β 形成 β -catenin降解复合体, 结合游离的 β -catenin并使其泛素化, 使得胞浆内的 β -catenin维持在比较低的水平。一旦有Wnt与细胞膜上受体Frizzled及辅助受体与辅助受体-低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(LRP5/6)结合, GSK-3 β 磷酸化, 将信号从胞外传至胞浆内, 使 β -catenin降解复合体解离, 游离的 β -catenin增多, 并转位至细胞核与LEF/TCF相互作用, TCF/LEF发生磷酸化, 促进下游靶基因Fn、c-myc的转录增多, 参与一系列生理病理反应^[7-8]。最近的研究表明, Wnt/ β -catenin信号通路参与了肾纤维化过程。有研究^[9]发现, 高糖可诱导人类肾小管上皮细胞(HK2)的Wnt/ β -catenin信号通路活化, 同时平滑肌动蛋白(β -smooth muscle actin, α -SMA)表达增多, E钙

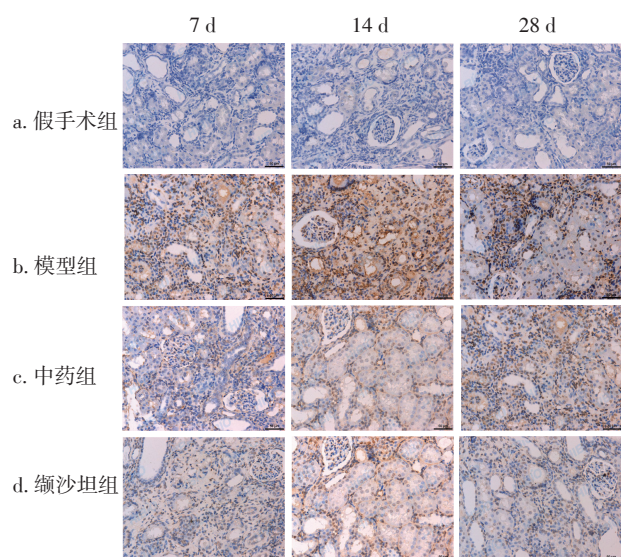


图2 各组大鼠肾组织c-myc蛋白表达分布比较(免疫组织化学法, $\times 200$)

Figure 2 Comparison of distribution of c-myc expression in kidney tissue of various groups (by immunohistochemical method, $\times 200$)

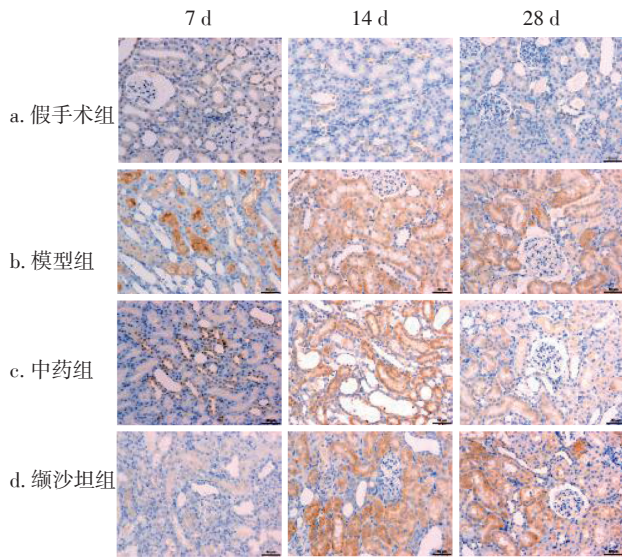


图3 各组大鼠肾组织Fn表达分布比较(免疫组织化学法, ×200)

Figure 3 Comparison of distribution of Fn expression in kidney tissue of various groups (by immunohistochemical method, ×200)

表2 各组大鼠肾组织c-myc、Fn蛋白表达水平比较

Table 2 Comparison of the protein expression levels of c-myc and Fn in kidney tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点(d)	鼠数(只)	c-myc OD值	Fn OD值
假手术组	7	10	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.04
	14	10	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.05
	28	10	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.03
模型组	7	10	0.29 ± 0.11 ^①	0.26 ± 0.13 ^①
	14	10	0.76 ± 0.23 ^①	0.64 ± 0.21 ^①
	28	10	0.54 ± 0.17 ^①	0.53 ± 0.14 ^①
中药组	7	10	0.17 ± 0.08 ^③	0.16 ± 0.04 ^③
	14	10	0.55 ± 0.16 ^②	0.50 ± 0.13 ^②
	28	10	0.42 ± 0.14 ^②	0.39 ± 0.11 ^②
缬沙坦组	7	10	0.19 ± 0.10 ^②	0.15 ± 0.07 ^②
	14	10	0.48 ± 0.13 ^②	0.47 ± 0.12 ^②
	28	10	0.38 ± 0.11 ^②	0.36 ± 0.09 ^②

①P < 0.01, 与假手术组相同时间点比较; ②P < 0.05, ③P < 0.01, 与模型组相同时间点比较

黏素表达减少, 而 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂 DKK-1 可以逆转这种改变, 提示 Wnt/β-catenin 信号通路活化参与了糖尿病肾病肾小管上皮-肌成纤维转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 过程。而研究^[10]发现, 单侧输尿管梗阻大鼠肾间质的 Wnt/β-catenin 信号通路活化, 可通过促使巨

噬细胞 M2 型极化参与肾间质纤维化过程。

本研究结果发现, 假手术组大鼠肾组织仅存在少量的 Wnt4、β-catenin、p-GSK-3β、p-LEF/TCF 表达, 而单侧输尿管梗阻大鼠第 7 天即开始出现肾组织 Wnt4、β-catenin、p-GSK-3β、p-LEF/TCF 明显的表达上调, 第 14 天达到高峰, 表明单侧输尿管梗阻可诱导大鼠肾间质经典 Wnt4/β-catenin 信号途径活化, 促使其下游的信号分子 GSK-3β 和 LEF/TCF 磷酸化增强, 参与了促肾间质纤维化的发生和发展, 这与 Abbas 和 Sun 等学者的研究^[11-12]一致。前已述及, Fn、c-myc 是 Wnt4/β-catenin 信号途径下游的靶基因。Fn 是细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的重要组成部分, 它们的过度沉积是肾间质纤维化形成的最基本病理改变^[13]。而 c-myc 是原癌基因, 主要功能为促进细胞的增殖, 在正常肾组织仅有低表达, 单侧输尿管梗阻大鼠模型肾组织可见 c-myc 明显增加, 参与肾纤维化的形成和发展^[14]。本研究结果发现, 假手术组大鼠肾组织仅存在少量 Fn、c-myc 表达, 而单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 Fn、c-myc 的表达明显上调, 并且其高峰时间与 Wnt4/β-catenin 信号通路活化一致, 均为 14 d, 提示 Wnt4/β-catenin 信号通路活化导致下游的致纤维化因子 Fn、c-myc 转录增多, 参与了肾间质纤维化的过程。

目前中医学认为, 肾间质纤维化的病因病机为本虚标实, 本虚为脾肾两虚, 标实为水湿瘀毒, 病理改变具有“虚、瘀、湿、毒”的特点。我们根据单味药研究的结果, 在六味地黄汤的基础上加入桂枝、大黄、黄芪、丹参, 取桂枝通阳利水湿、大黄通便以排毒、黄芪益气健脾利水、丹参活血化瘀, 取名加味六味地黄汤, 全方共奏补肾、利水活血、排毒的功能^[6]。既往我们的研究^[6]结果已证实, 加味六味地黄汤能够降低单侧输尿管梗阻大鼠尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)酶、尿素氮(BUN)和血清肌酐(SCr)水平, 改善肾纤维化, 加味六味地黄汤具有较强的抗肾间质纤维化的作用。本研究中, 我们进一步探讨了加味六味地黄汤对肾间质纤维化 Wnt4/β-catenin 信号分子(磷酸化 GSK-3β、LEF/TCF)以及 Fn 和 c-myc 表达的影响。本研究结果发现, 加味六味地黄汤干预后, 单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 Wnt4、β-catenin、p-GSK-3β、p-TCF/LEF、Fn 和

c-myc 蛋白的表达水平显著下调,表明加味六味地黄汤可阻断大鼠肾间质纤维化 Wnt/ β -catenin 信号的活化,抑制下游信号分子 GSK-3 β 和 TCF/LEF 的磷酸化,继而减少了下游靶基因 Fn 和 c-myc 的转录,提示这可能是加味六味地黄汤新的抗肾间质纤维化机制。

综上所述,加味六味地黄汤可能通过阻断 Wnt4/ β -catenin 信号通路的活化,下调 Fn 和 c-myc 蛋白的表达,发挥抗肾间质纤维化的作用。

参考文献:

- [1] 黄仁发, 史伟, 吴金玉, 等. 怡肾汤治疗慢性肾衰竭的疗效观察及对免疫功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 52-54.
- [2] 黄仁发, 梁群卿, 邓鸣, 等. 加味六味地黄汤对 UUO 大鼠肾组织 Wnt4/ β -catenin 信号通路介导调控 FGF-23 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(4): 285-289.
- [3] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169: 985-999.
- [4] CHEN N, WANG J. Wnt/ β -catenin signaling and obesity [J]. Front Physiol, 2018, 9: 792.
- [5] KIEWISZ J, SKOWRONSKA A, WINIARSKA A, et al. WNT4 expression in primary and secondary kidney diseases: dependence on staging [J]. Kidney Blood Press Res, 2019, 44(2): 200-210.
- [6] WANG Y P, ZHOU C J, LIU Y H, et al. Wnt signaling in kidney development and disease [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2018, 153: 181-207.
- [7] HE W H, TAN R J, LI Y J, et al. Matrix metalloproteinase-7 as a surrogate marker predicts renal Wnt/ β -catenin activity in CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(2): 294-304.
- [8] 刘洋, 张晨光, 周春燕. 经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中的双向调控[J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42(2): 238-241.
- [9] ZHANG J, JIANG T T, LIANG X J, et al. lncRNA MALAT1 mediated high glucose-induced HK-2 cell epithelial-to-mesenchymal transition and injury [J]. J Physiol Biochem, 2019, 75(4): 443-452.
- [10] FENG Y, REN J F, GUI Y, et al. Wnt/ β -Catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(1): 182-193.
- [11] ABBAS N A T, EL SALEM A, AWAD M M, et al. SGLT2 inhibitor, attenuates renal fibrosis in rats exposed to unilateral ureteric obstruction: potential role of klotho expression [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(12): 1347-1360.
- [12] SUN C, ZHANG G, CHENG S, et al. URG11 promotes proliferation and induced apoptosis of LNCaP cells [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(5): 2075-2085.
- [13] LEMANŃSKA-PEREK A, ADAMIK B. Fibronectin and its soluble EDA-FN isoform as biomarkers for inflammation and sepsis [J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(11): 1561-1567.
- [14] VOELKL J, MIA S, MEISSNER A, et al. PKB/SKG-resistant GSK-3 signaling following unilateral ureteral obstruction [J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 38(1): 156-164.

【责任编辑: 侯丽颖】